





Path.



Class 615.05

Book 248

Acc. 170191

Pl. 1 V3

















Zeitschrift  
für  
**Immunitätsforschung**  
und experimentelle Therapie

**I. Teil: Originale**

Unter Mitwirkung von:

**H. Apolant**, Frankfurt a. M., **V. Babes**, Bukarest, **O. Ball**, Prag, **E. F. Bashford**, London, **S. Belfanti**, Mailand, **A. Besredka**, Paris, **J. Bordet**, Brüssel, **A. Breinl**, Liverpool, **L. Brieger**, Berlin, **A. Calmette**, Lille, **A. Dieudonné**, München, **R. Doerr**, Wien, **M. Dorset**, Washington, **E. v. Dungern**, Heidelberg, **P. Ehrlich**, Frankfurt a. M., **S. Flexner**, New York, **U. Friedemann**, Berlin, **P. Frosch**, Berlin, **G. Gaffky**, Berlin, **M. von Gruber**, München, **M. Hahn**, München, **A. Heffter**, Berlin, **L. Hektoen**, Chicago, **M. Jacoby**, Berlin, **C. O. Jensen**, Kopenhagen, **S. Kitasato**, Tokio, **R. Koch**, Berlin, **W. Kolle**, Bern, **W. Kruse**, Königsberg i. Pr., **K. Landsteiner**, Wien, **C. Levaditi**, Paris, **L. von Liebermann**, Budapest, **F. Loeffler**, Greifswald, **Th. Madsen**, Kopenhagen, **C. J. Martin**, London, **E. Metschnikoff**, Paris, **L. Michaelis**, Berlin, **R. Muir**, Glasgow, **C. Moreschl**, Pavia, **P. Th. Müller**, Graz, **M. Neisser**, Frankfurt a. M., **F. Neufeld**, Berlin, **F. Nuttall**, Cambridge, **R. Ostertag**, Berlin, **R. Paltauf**, Wien, **A. Pettersson**, Stockholm, **R. Pfeiffer**, Breslau, **E. P. Plek**, Wien, **P. Römer**, Marburg, **C. J. Salomonsen**, Kopenhagen, **A. Schattenfroh**, Wien, **Cl. Schilling**, Berlin, **Th. Smith**, Boston, **G. Sobernheim**, Berlin, **V. C. Vaughan**, Ann Arbor, **A. Wassermann**, Berlin, **W. Welchardt**, Erlangen, **A. Wladimiroff**, St. Petersburg, **A. E. Wright**, London, **D. Zabolotny**, St. Petersburg

herausgegeben von:

**E. FRIEDBERGER**  
(Berlin.)

**R. KRAUS**  
(Wien.)

**H. SACHS**  
(Frankfurt a. M.)

**P. UHLENHUTH**  
(Gr.-Lichterfelde-Berlin.)

**Dritter Band.**

Mit 3 Tafeln, sowie 27 Figuren und 11 Kurven im Text.



**Jena**  
Verlag von Gustav Fischer  
1909



UNIVERSITY STATE  
AND TO  
VIRGIL

615.25  
754  
75

---

Alle Rechte vorbehalten.

---

## Inhaltsverzeichnis.

### Heft 1. (Ausgegeben am 15. Juli 1909.)

	Seite
<b>Sohna, M., und Willenka, M.,</b> Ueber Meconiumpräzipitine. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf] . . . . .	1
<b>Kraus, R., und Baecher, St.,</b> Ueber Meningokokkenserum. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. Dr. R. Paltauf] . . . . .	9
<b>Kraus, R., und Fukuhara, Y.,</b> Weitere Beiträge zur Differenzierung des Choleravibrio von anderen Vibrionen mittels der Hämotoxine. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf] . . . . .	33
<b>Ranzi, E., und Ehrlich, H.,</b> Ueber die Wirkung von Toxinen und die Bildung von Antikörpern bei parabisotischen Tieren. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut (Hofrat Prof. Paltauf) und der I. chirurgischen Universitätsklinik (Hofrat Prof. A. Freiherr v. Eiselsberg) in Wien] . . . . .	38
<b>Römer, Paul H., und Sames, Th.,</b> Beiträge zur antitoxischen Immunisierung auf intestinale Wege. [Aus der experimentellen Abteilung des Instituts für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg] . . . . .	49
<b>Walbum, L. E.,</b> Studien über Toxinbildung. [Aus Statens Serum-institut Kopenhagen; Direktor: Dr. Th. Madsen.] Mit 1 Figur und 3 Kurven im Text . . . . .	70
<b>Altmann, K., und Schultz, J. H.,</b> Verwendung von Bakterien-Antiforminextrakten als Antigene bei der Komplementbindung. [Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.; Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. P. Ehrlich (Bakteriologisch-hygienische Abteilung: Prof. M. Neisser)] . .	98
<b>Apolant, H.,</b> Ueber die Empfindlichkeit von Krebsmäusen gegen intraperitoneale Tumordinjektionen. [Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.; Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. P. Ehrlich] . . . . .	108
<b>Meyer, Kurt,</b> Ueber die Beziehungen der Immunhämolyse zu den Lipoiden. [Aus dem sero-bakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin] . . . . .	114

Path. 1909, 1910, 1911, 1912, 1913, 1914, 1915, 1916, 1917, 1918, 1919, 1920, 1921, 1922, 1923, 1924, 1925, 1926, 1927, 1928, 1929, 1930, 1931, 1932, 1933, 1934, 1935, 1936, 1937, 1938, 1939, 1940, 1941, 1942, 1943, 1944, 1945, 1946, 1947, 1948, 1949, 1950, 1951, 1952, 1953, 1954, 1955, 1956, 1957, 1958, 1959, 1960, 1961, 1962, 1963, 1964, 1965, 1966, 1967, 1968, 1969, 1970, 1971, 1972, 1973, 1974, 1975, 1976, 1977, 1978, 1979, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189, 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198, 2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213, 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219, 2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243, 2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258, 2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264, 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273, 2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288, 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303, 2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309, 2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318, 2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324, 2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333, 2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339, 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348, 2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354, 2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363, 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369, 2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378, 2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384, 2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393, 2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408, 2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414, 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429, 2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438, 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444, 2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453, 2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459, 2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474, 2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483, 2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489, 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498, 2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504, 2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513, 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519, 2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528, 2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534, 2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2606, 2607, 2608, 2609, 2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624, 2625, 2626, 2627, 2628, 2629, 2630, 2631, 2632, 2633, 2634, 2635, 2636, 2637, 2638, 2639, 2640, 2641, 2642, 2643, 2644, 2645, 2646, 2647, 2648, 2649, 2650, 2651, 2652, 2653, 2654, 2655, 2656, 2657, 2658, 2659, 2660, 2661, 2662, 2663, 2664, 2665, 2666, 2667, 2668, 2669, 2670, 2671, 2672, 2673, 2674, 2675, 2676, 2677, 2678, 2679, 2680, 2681, 2682, 2683, 2684, 2685, 2686, 2687, 2688, 2689, 2690, 2691, 2692, 2693, 2694, 2695, 2696, 2697, 2698, 2699, 2700, 2701, 2702, 2703, 2704, 2705, 2706, 2707, 2708, 2709, 2710, 2711, 2712, 2713, 2714, 2715, 2716, 2717, 2718, 2719, 2720, 2721, 2722, 2723, 2724, 2725, 2726, 2727, 2728, 2729, 2730, 2731, 2732, 2733, 2734, 2735, 2736, 2737, 2738, 2739, 2740, 2741, 2742, 2743, 2744, 2745, 2746, 2747, 2748, 2749, 2750, 2751, 2752, 2753, 2754, 2755, 2756, 2757, 2758, 2759, 2760, 2761, 2762, 2763, 2764, 2765, 2766, 2767, 2768, 2769, 2770, 2771, 2772, 2773, 2774, 2775, 2776, 2777, 2778, 2779, 2780, 2781, 2782, 2783, 2784, 2785, 2786, 2787, 2788, 2789, 2790, 2791, 2792, 2793, 2794, 2795, 2796, 2797, 2798, 2799, 2800, 2801, 2802, 2803, 2804, 2805, 2806, 2807, 2808, 2809, 2810, 2811, 2812, 2813, 2814, 2815, 2816, 2817, 2818, 2819, 2820, 2821, 2822, 2823, 2824, 2825, 2826, 2827, 2828, 2829, 2830, 2831, 2832, 2833, 2834, 2835, 2836, 2837, 2838, 2839, 2840, 2841, 2842, 2843, 2844, 2845, 2846, 2847, 2848, 2849, 2850, 2851, 2852, 2853, 2854, 2855, 2856, 2857, 2858, 2859, 2860, 2861, 2862, 2863, 2864, 2865, 2866, 2867, 2868, 2869, 2870, 2871, 2872, 2873, 2874, 2875, 2876, 2877, 2878, 2879, 2880, 2881, 2882, 2883, 2884, 2885, 2886, 2887, 2888, 2889, 2890, 2891, 2892, 2893, 2894, 2895, 2896, 2897, 2898, 2899, 2900, 2901, 2902, 2903, 2904, 2905, 2906, 2907, 2908, 2909, 2910, 2911, 2912, 2913, 2914, 2915, 2916, 2917, 2918, 2919, 2920, 2921, 2922, 2923, 2924, 2925, 2926, 2927, 2928, 2929, 2930, 2931, 2932, 2933, 2934, 2935, 2936, 2937, 2938, 2939, 2940, 2941, 2942, 2943, 2944, 2945, 2946, 2947, 2948, 2949, 2950, 2951, 2952, 2953, 2954, 2955, 2956, 2957, 2958, 2959, 2960, 2961, 2962, 2963, 2964, 2965, 2966, 2967, 2968, 2969, 2970, 2971, 2972, 2973, 2974, 2975, 2976, 2977, 2978, 2979, 2980, 2981, 2982, 2983, 2984, 2985, 2986, 2987, 2988, 2989, 2990, 2991, 2992, 2993, 2994, 2995, 2996, 2997, 2998, 2999, 3000, 3001, 3002, 3003, 3004, 3005, 3006, 3007, 3008, 3009, 3010, 3011, 3012, 3013, 3014, 3015, 3016, 3017, 3018, 3019, 3020, 3021, 3022, 3023, 3024, 3025, 3026, 3027, 3028, 3029, 3030, 3031, 3032, 3033, 3034, 3035, 3036, 3037, 3038, 3039, 3040, 3041, 3042, 3043, 3044, 3045, 3046, 3047, 3048, 3049, 3050, 3051, 3052, 3053, 3054, 3055, 3056, 3057, 3058, 3059, 3060, 3061, 3062, 3063, 3064, 3065, 3066, 3067, 3068, 3069, 3070, 3071, 3072, 3073, 3074, 3075, 3076, 3077, 3078, 3079, 3080, 3081, 3082, 3083, 3084, 3085, 3086, 3087, 3088, 3089, 3090, 3091, 3092, 3093, 3094, 3095, 3096, 3097, 3098, 3099, 3100, 3101, 3102, 3103, 3104, 3105, 3106, 3107, 3108, 3109, 3110, 3111, 3112, 3113, 3114, 3115, 3116, 3117, 3118, 3119, 3120, 3121, 3122, 3123, 3124, 3125, 3126, 3127, 3128, 3129, 3130, 3131, 3132, 3133, 3134, 3135, 3136, 3137, 3138, 3139, 3140, 3141, 3142, 3143, 3144, 3145, 3146, 3147, 3148, 3149, 3150, 3151, 3152, 3153, 3154, 3155, 3156, 3157, 3158, 3159, 3160, 3161, 3162, 3163, 3164, 3165, 3166, 3167, 3168, 3169, 3170, 3171, 3172, 3173, 3174, 3175, 3176, 3177, 3178, 3179, 3180, 3181, 3182, 3183, 3184, 3185, 3186, 3187, 3188, 3189, 3190, 3191, 3192, 3193, 3194, 3195, 3196, 3197, 3198, 3199, 3200, 3201, 3202, 3203, 3204, 3205, 3206, 3207, 3208, 3209, 3210, 3211, 3212, 3213, 3214, 3215, 3216, 3217, 3218, 3219, 3220, 3221, 3222, 3223, 3224, 3225, 3226, 3227, 3228, 3229, 3230, 3231, 3232, 3233, 3234, 3235, 3236, 3237, 3238, 3239, 3240, 3241, 3242, 3243, 3244, 3245, 3246, 3247, 3248, 3249, 3250, 3251, 3252, 3253, 3254, 3255, 3256, 3257, 3258, 3259, 3260, 3261, 3262, 3263, 3264, 3265, 3266, 3267, 3268, 3269, 3270, 3271, 3272, 3273, 3274, 3275, 3276, 3277, 3278, 3279, 3280, 3281, 3282, 3283, 3284, 3285, 3286, 3287, 3288, 3289, 3290, 3291, 3292, 3293, 3294, 3295, 3296, 3297, 3298, 3299, 3300, 3301, 3302, 3303, 3304, 3305, 3306, 3307, 3308, 3309, 3310, 3311, 3312, 3313, 3314, 3315, 3316, 3317, 3318, 3319, 3320, 3321, 3322, 3323, 3324, 3325, 3326, 3327, 3328, 3329, 3330, 3331, 3332, 3333, 3334, 3335, 3336, 3337, 3338, 3339, 3340, 3341, 3342, 3343, 3344, 3345, 3346, 3347, 3348, 3349, 3350, 3351, 3352, 3353, 3354, 3355, 3356, 3357, 3358, 3359, 3360, 3361, 3362, 3363, 3364, 3365, 3366, 3367, 3368, 3369, 3370, 3371, 3372, 3373, 3374, 3375, 3376, 3377, 3378, 3379, 3380, 3381, 3382, 3383, 3384, 3385, 3386, 3387, 3388, 3389, 3390, 3391, 3392, 3393, 3394, 3395, 3396, 3397, 3398, 3399, 3400, 3401, 3402, 3403, 3404, 3405, 3406, 3407, 3408, 3409, 3410, 3411, 3412, 3413, 3414, 3415, 3416, 3417, 3418, 3419, 3420, 3421, 3422, 3423, 3424, 3425, 3426, 3427, 3428, 3429, 3430, 3431, 3432, 3433, 3434, 3435, 3436, 3437, 3438, 3439, 3440, 3441, 3442, 3443, 3444, 3445, 3446, 3447, 3448, 3449, 3450, 3451, 3452, 3453, 3454, 3455, 3456, 3457, 3458, 3459, 3460, 3461, 3462, 3463, 3464, 3465, 3466, 3467, 3468, 3469, 3470, 3471, 3472, 3473, 3474, 3475, 3476, 3477, 3478, 3479, 3480, 3481, 3482, 3483, 3484, 3485, 3486, 3487, 3488, 3489, 3490, 3491, 3492, 3493, 3494, 3495, 3496, 3497, 3498, 3499, 3500, 3501, 3502, 3503, 3504, 3505, 3506, 3507, 3508, 3509, 3510, 3511, 3512, 3513, 3514, 3515, 3516, 3517, 3518, 3519, 3520, 3521, 3522, 3523, 3524, 3525, 3526, 3527, 3528, 3529, 3530, 3531, 3532, 3533, 3534, 3535, 3536, 3537, 3538, 3539, 3540, 3541, 3542, 3543, 3544, 3545, 3546, 3547, 3548, 3549, 3550, 3551, 3552, 3553, 3554, 3555, 3556, 3557, 3558, 3559, 3560, 3561, 3562, 3563, 3564, 3565, 3566, 3567, 3568, 3569, 3570, 3571, 3572, 3573, 3574, 3575, 3576, 3577, 3578, 3579, 3580, 3581, 3582, 3583, 3584, 3585, 3586, 3587, 3588, 3589, 3590, 3591, 3592, 3593, 3594, 3595, 3596, 3597, 3598, 3599, 3600, 3601, 3602, 3603, 3604, 3605, 3606, 3607, 3608, 3609, 3610, 3611, 3612, 3613, 3614, 3615, 3616, 3617, 3618, 3619, 3620, 3621, 3622, 3623, 3624, 3625, 3626, 3627, 3628, 3629, 3630, 3631, 3632, 3633, 3634, 3635, 3636, 3637, 3638, 3639, 3640, 3641, 3642, 3643, 3644, 3645, 3646, 3647, 3648, 3649, 3650, 3651, 3652, 3653, 3654, 3655, 3656, 3657, 3658, 3659, 3660, 3661, 3662, 3663, 3664, 3665, 3666, 3667, 3668, 3669, 3670, 3671, 3672, 3673, 3674, 3675, 3676, 3677, 3678, 3679, 3680, 3681, 3682, 3683, 3684, 3685, 3686, 3687, 3688, 3689, 3690, 3691, 3692, 3693, 3694, 3695, 3696, 3697, 3698, 3699, 3700, 3701, 3702, 3703, 3704, 3705, 3706, 3707, 3708, 3709, 3710, 3711, 3712, 3713, 3714, 3715, 3716, 3717, 3718, 3719, 3720, 3721, 3722, 3723, 3724, 3725, 3726, 3727, 3728, 3729, 3730, 3731, 3732, 3733, 3734, 3735, 3736, 3737, 3738, 3739, 3740, 3741, 3742, 3743, 3744, 3745, 3746, 3747, 3748, 3749, 3750, 3751, 3752, 3753, 3754, 3755, 3756, 3757, 3758, 3759, 3760, 3761, 3762, 3763, 3764, 3765, 3766, 3767, 3768, 3769, 3770, 3771, 3772, 3773, 3774, 3775, 3776, 3777, 3778, 3779, 3780



**Heft 2.** (Ausgegeben am 30. Juli 1909.)

	Seite
<b>Ledingham, J. C. G.</b> , The Phagocytosis of so-called neutral substances. [From the Lister Institute, London.] With Plate I . . . . .	119
<b>Kraus, R.</b> , und <b>Holobut, Th.</b> , Ueber die Wirkung des intraokulär injizierten rabiziden Serums. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien; Vorstand: Prof. Hofrat R. Paltauf]	130
<b>Kraus, R.</b> , Ueber die Giftigkeit der Serumhämolysine und über die Kriterien des anaphylaktischen Zustandes. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf] . . . . .	133
<b>Isabolinsky, M.</b> , Weitere Untersuchungen zur Theorie und Praxis der Serodiagnostik bei Syphilis. [Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern; Direktor: Prof. Dr. W. Kolle]	143
<b>Neufeld, F.</b> , und <b>Händel</b> , Ueber Herstellung und Prüfung von Antipneumokokkenserum und über die Aussichten einer spezifischen Behandlung der Pneumonie. [Aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte Berlin] . . . . .	159
<b>Nunokawa, K.</b> , Der Einfluß des Pneumokokkenaggressins auf die Phagocytose. [Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität Prag; Vorstand: Prof. F. Hueppe] . . . . .	172
<b>Doerr, R.</b> , und <b>Russ, V. K.</b> , Studien über Anaphylaxie. III. Der anaphylaktische Immunkörper und seine Beziehungen zum Eiweißantigen. [Aus dem bakteriologischen Laboratorium des k. und k. Militärsanitätskomitees in Wien] . . . . .	181
<b>Römer, Paul H.</b> , Ueber den Nachweis sehr kleiner Mengen des Diphtheriegiftes. [Aus der experimentellen Abteilung des Instituts für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg] . . . . .	208

**Heft 3.** (Ausgegeben am 13. August 1909.)

<b>Busson, Bruno, Müller, P. Th.</b> , und <b>Rintelen, Aug.</b> , Weitere Aviditätsstudien an Agglutininen. III.—VI. Mitteilung. [Aus dem Hygienischen Institut der Universität Graz.] — I. Einleitung. Von Prof. Paul Th. Müller. — II. Ueber den Zusammenhang von Agglutinationstiter und Avidität bei der Immunisierung mit Typhusbacillen. Mit 6 Kurven im Text. Von Dr. Bruno Busson. — III. Aviditätsstudien am Serum Typhuskranker. Von Dr. August Rintelen. — IV. Aviditätsstudien an schwer agglutinierbaren Typhuskranken. Von Prof. Paul Th. Müller	217
<b>Uhlenhuth und Haendel</b> , Ueber nekrotisierende Wirkung normaler Sera, speziell des Rinderserums . . . . .	284
<b>Ehrlich, P.</b> , <b>Roehl, W.</b> , und <b>Gulbransen, R.</b> , Ueber serumfeste Trypanosomenstämme. [Aus dem Georg-Speyer-Hause zu Frankfurt a. M.; Direktor: Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. P. Ehrlich]	296

	Seite
<b>Kraus, R., und Volk, R.,</b> Weitere Beiträge zur Frage der Serum-anaphylaxie. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.] Mit 2 Kurven im Text . . . . .	299

#### Heft 4. (Ausgegeben am 24. August 1909.)

<b>Manwaring, Wilfred H.,</b> Ueber die Beziehungen von Enzymwirkungen zu den Erscheinungen der sogenannten Komplementablenkung bei Syphilis. [Aus dem Kgl. preuß. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin; Direktor: Geh. Obermedizinalrat Dr. Gaffky. Abteilungsvorsteher: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Wassermann.] Mit 14 Figuren im Text . . . . .	309
<b>Nedrigaloff, W.,</b> Ueber die Anwendung der Komplementbindungsmethode zur Untersuchung von Cholerafaeces. [Aus dem Bakteriologischen Institut der Medizinischen Gesellschaft in Charkow]	338
<b>Römer, Paul H., und Sames, Th.,</b> Zur Bestimmung sehr kleiner Mengen Diphtherieantitoxins. [Aus der experimentellen Abteilung des Instituts für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg]	344
<b>Kraus, R., und Fukuhara, Y.,</b> Ueber das Lyssavirus „Fermi“, über Schutzimpfungsversuche mit normaler Nervensubstanz und über Wirkungen des rabiziden Serums. [Aus dem staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf] . . . . .	352
<b>Helmholz, Henry F.,</b> Ueber passive Uebertragung der Tuberkulin-Ueberempfindlichkeit bei Meerschweinchen. [Aus dem staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien (Hofrat Prof. Paltauf) und der Universitätskinderklinik (Hofrat Prof. Escherich)] . . . .	371
<b>Eisenberg, Philipp, und Nitsch, Roman,</b> Ueber die Wassermannsche Probe mit künstlichem Antigen. [Aus dem k. k. hygienisch-bakteriologischen Institut der Jag. Universität Krakau; Vorstand: Prof. O. Bujwid] . . . . .	376
<b>Löwenstein, E.,</b> Ueber das Verhalten der Eiterzellen verschiedener Herkunft gegenüber den Tuberkelbacillen. [Aus den Lungenheilstätten Beelitz der Landesversicherung Berlin (Chefarzt: Dr. Pickert).] Mit 1 Figur im Text . . . . .	388
<b>Laub, M., und Novotný, J.,</b> Ueber die Brauchbarkeit der Porgeschen Ausflockungsreaktion für die Diagnose der Lues an Leichen. [Aus dem staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf] . . . . .	394
<b>Müller, M.,</b> Ueber die Verwendbarkeit der Präzipitinreaktion zur Rotzdiagnose und die Beziehungen der Rotzpräzipitine zu den Rotzagglutininen. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie an der Universität Straßburg; Direktor: Professor Dr. Forster.] Mit 1 Figur im Text . . . . .	401
<b>Wendelstadt, H., und Fellmer, T.,</b> Einwirkung von Kaltblüterpassagen auf Nagana- und Lewisi-Trypanosomen . . . . .	422

**Heft 5.** (Ausgegeben am 25. September 1909.)

	Seite
<b>Bömer, H. Paul, und Somogyi, Rudolf,</b> Eine einfache Methode der Diphtherieserumbewertung. [Aus der experimentellen Abteilung des Instituts für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg]	433
<b>Adler, Heinrich,</b> Ueber Autospermotoxine. [Aus der biologischen Abteilung (Prof. v. Dungern) des Instituts für Krebsforschung (Exz. Czerny) in Heidelberg]	447
<b>Szily, Aurel von,</b> Ueber den Einfluß der Osmiumsäure auf das Ambozeptorbindungsvermögen der roten Blutzellen. [Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Instituts für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. P. Ehrlich)]	451
<b>Amako, T., und Kojima, K.,</b> Weitere Studien über verschiedene Typen von Dysenteriebacillen und ihre Differenzierung durch die Komplementbindungsmethode. [Aus dem städtischen Krankenhaus für Infektionskrankheiten zu Kobe, Japan]	467
<b>Fellmer, T.,</b> Stoffwechseluntersuchungen bei mit Nagana-Trypanosomen infizierten Kaninchen. [Aus dem Laboratorium von Prof. Dr. H. Wendelstadt, Bonn]	474
<b>De Waele, Henri,</b> Recherches sur l'anaphylaxie contre les toxines et sur le mode d'absorption des toxines. [Travail du Laboratoire d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de Gand]	478
<b>De Waele, Henri,</b> Du rôle des lécithines dans l'absorption et l'action des alcaloides. [Travail du Laboratoire d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de Gand]	504
<b>Kleinschmidt, Hans,</b> Ueber die Sternsche Modifikation der Wassermannschen Reaktion. [Aus der Abteilung für experimentelle Therapie des Eppendorfer Krankenhauses, Hamburg (Oberarzt: Dr. Much)]	512
<b>Kleinschmidt, Hans,</b> Fibrinbildende und -auflösende Wirkung von Staphylokokken (Staphylokinase und Staphylofibrinolyse). [Aus der Abteilung für experimentelle Therapie des Eppendorfer Krankenhauses, Hamburg (Oberarzt: Dr. Much)]	516
<b>Wechselmann,</b> Ueber Verschleierung der Wassermannschen Reaktion durch Komplementoidverstopfung. [Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin (Abteilung des Herrn Geh. Med.-Rats Prof. Dr. Wassermann)]	525

**Heft 6.** (Ausgegeben am 27. Oktober 1909.)

<b>Braun, H.,</b> Zur Frage der Serumüberempfindlichkeit. [Aus der medizinischen Abteilung (Abteilungsvorsteher: Dr. A. Meyer) des Hygienischen Institutes in Bremen (mit der Oberleitung beauftragt: Prof. Dr. Tjaden)]	531
<b>Thomsen, Oluf,</b> Untersuchungen über die Blutanaphylaxie und die Möglichkeit ihrer Anwendung in der Gerichtsmedizin. [Aus dem Statens Seruminstitut Kopenhagen]	539



	Seite
<b>Kiss, Julius</b> , Untersuchungen über die Fermentnatur des Komplementes. [Aus dem Hauptstädtischen Bakteriologischen Institute in Budapest (Leiter: Doz. Dr. Bernhard Vas)] . . . . .	558
<b>Friedberger, E., und Hartoch, O.</b> , Ueber das Verhalten des Komplements bei der aktiven und passiven Anaphylaxie. [Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin; Direktor: Geheimrat Professor Dr. Heffter (Abteilung für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie; Leiter: Professor Dr. E. Friedberger).] Mit Tafel II . . . . .	581

**Heft 7. (Ausgegeben am 13. November 1909.)**

<b>Holobut, Th.</b> , Zur Frage der Bakterienanaphylaxie. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf] . . . . .	639
<b>Kraus, R., und v. Stenitzer, R.</b> , Ueber Gifte der Typhusbacillen und über giftneutralisierende Eigenschaften des Immunserums. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf] . . . . .	646
<b>Novotný, J., und Schick, B.</b> , Versuche über homologe und heterologe passive Anaphylaxie. [Aus der k. k. Pädiatrischen Klinik (Vorstand: Hofrat Prof. Escherich) und dem k. k. Serotherapeutischen Institut (Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf)] . . . . .	671
<b>Novotný, J.</b> , Ist die Temperatursteigerung als Kriterium bei der passiven Uebertragung der Tuberkuloseüberempfindlichkeit anzusehen? [Aus dem k. k. Serotherapeutischen Institute in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf] . . . . .	679
<b>Kraus, R., und Novotný, J.</b> , Zur Theorie Friedbergers über Anaphylaxie. [Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien; Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf] . . . . .	683
<b>Friedberger, E.</b> , Weitere Mitteilung über Anaphylaxie. III. Erwiderung auf die vorstehende Arbeit von Kraus und Novotný: „Zur Theorie Friedbergers über Anaphylaxie“. [Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin; Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie; Leiter: Prof. Dr. E. Friedberger).] Mit Tafel III . . . . .	692
<b>Doerr, R., und Russ, V. K.</b> , Studien über Anaphylaxie. IV. [Aus dem Bakteriologischen Laboratorium des k. u. k. Militärsanitätskomitees in Wien] . . . . .	706
<b>Friedemann, U.</b> , Ueber die Kriterien des anaphylaktischen Zustandes. Erwiderung auf den Aufsatz des Herrn Prof. R. Kraus . . . . .	726
<b>Sauerbeck, Ernst</b> , Experimentelle Studien über Phagocytose. [Aus der bakteriologischen Abteilung des Pathologischen Instituts Basel.] Mit 10 Figuren im Text . . . . .	731

## Autorenverzeichnis.

- Adler 447.  
Amako und Kojima 467.  
Altmann und J. H. Schultz 98.  
Apolant 108.  
Braun 531.  
Busson, P. Th. Müller und Rintelen 217.  
De Waele 478, 504.  
Doerr und Russ 181, 706.  
Ehrlich, Roehl und Gulbransen 296.  
Eisenberg und Nitsch 376.  
Fellmer 474.  
Friedberger 692.  
Friedberger und Hartoch 581.  
Friedemann 726.  
Helmholz 371.  
Holobut 639.  
Isabolinsky 143.  
Kleinschmidt 512, 516.  
Kiss 558.  
Kraus 133.  
Kraus und Baecher 9.  
Kraus und Fukuhara 33, 352.  
Kraus und Holobut 130.  
Kraus und Novotný 683.  
Kraus und v. Stenitzer 646.  
Kraus und Volk 299.  
Laub und Novotný 394.  
Ledingham 119.  
Löwenstein 388.  
Manwaring 309.  
Meyer, Kurt 114.  
Müller, M. 401.  
Nedrigailoff 338.  
Neufeld und Händel 159.  
Novotný 679.  
Novotný und Schick 671.  
Nunokawa 172.  
Ranzi und Ehrlich 38.  
Römer 208.  
Römer und Sames 49, 344.  
Römer und Somogyi 433.  
Sauerbeck 731.  
Sohma und Wilenko 1.  
v. Szily 451.  
Thomsen 539.  
Uhlenhuth und Händel 284.  
Walbum 70.  
Wechselmann 525.  
Wendelstadt und Fellmer 422.

# Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. III. No. 1

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

## Ueber Meconiumpräzipitate<sup>1)</sup>.

Von Dr. **M. Sohma** (Tokio) und Dr. **M. Wilenko** (Wien).

(Eingegangen bei der Redaktion am 9. Juni 1909.)

Ueber Meconium liegen nur Arbeiten in chemischer, morphologischer und bakteriologischer Richtung vor. Wie bekannt, erfolgt die erste Meconiumentleerung zuweilen schon während der Geburt bei längerer Dauer derselben, oder wenige Stunden nach der Geburt. Meconium bildet makroskopisch betrachtet eine dunkelbraune, meist geruchlose, homogene, fadenziehende Masse, von teerartiger Beschaffenheit; mikroskopisch findet man Wollhärchen, Cholesterintäfelchen Epithelmisplättchen (aus dem im Fötalleben verschluckten Fruchtwasser), Epithelzellen und sogenannte Meconiumkörperchen. Es sind das grünlichgelbe, ovale oder rundliche Körper von scholligem Aussehen; sie bestehen wahrscheinlich aus einer eiweißartigen Grundsubstanz (da die Millonsche Eiweißreaktion, mikrochemisch ausgeführt, wenn nicht ausgesprochen, so doch angedeutet ist). Die Grundsubstanz stammt wahrscheinlich von den Epithelzellen verschiedener Art. Die Färbung der Stühle sowie der Meconiumkörperchen rührt von Gallenbestandteilen her (Bilirubin und Biliverdin). Von anderen Gallenbestandteilen ist im Meconium Spur von Gallensäure zu verzeichnen.

Die Reaktion des Meconiums ist infolge des Gehaltes an Fettsäuren schwach sauer. Wasserlösliche Eiweißkörper fehlen im Meconium, Nucleine kommen dagegen vor. Der Nuclein-gehalt des Meconiums stammt — da Nahrung und Bakterien

---

1) Nach einem Vortrag in der Sitzung der freien Vereinigung für Mikrobiologie (3. Tagung) in Wien am 5. Juni.

als Ursprungsquelle für die Nucleine auszuschließen sind — wahrscheinlich aus den Darmepithelien. Von den anorganischen Verbindungen ist eine große Menge von Alkalien an Schwefelsäure gebunden und Eisen zu verzeichnen. Der als Meconium zu bezeichnende Stuhl findet sich in den ersten zwei Tagen, zuweilen noch am dritten, vom vierten Tage an beginnt der Stuhl das für Säuglingsfaeces charakteristische Aussehen anzunehmen. — In biologischer Richtung ist Meconium — unseres Wissens — nicht untersucht worden. Das interessante biologische Verhalten des Menschenkotes von Erwachsenen, das zuerst Brezina und dann einer von uns (Wilenko) untersucht hat, veranlaßte uns — auf Anregung des Herrn Prof. Kraus — auch Meconium in den Bereich unserer Untersuchungen einzubeziehen. Die Fragen, die wir uns gestellt haben, waren folgende: 1) ob ein spezifisches Meconiumpräzipitin zu gewinnen ist; 2) das eventuelle Verhalten desselben gegen andere Darminhaltextrakte und Menschenserum, sowie das Verhalten des Meconiumextraktes gegen andere Darminhaltpräzipitine und Menschenimmenserum; 3) ob der Stuhl demselben Individuum, an verschiedenen Tagen nach der Geburt entnommen, eine Aenderung der biologischen Reaktion je nach der Zeit der Entnahme zeigt.

Unsere Versuchstechnik war folgende: 1 g Meconium wurde mit der fünffachen Menge physiologischer Kochsalzlösung verrieben, scharf zentrifugiert, bis sich die gröberen Stücke abgesetzt hatten. Von der abpipettierten Flüssigkeit wurden, nach Versetzung mit Karbolsäure (bis 0,5 Proz.), die gewünschten Verdünnungen gemacht. Diese wurden filtriert und das klare Filtrat zum Versuche verwendet.

Die Immunisierung der Tiere erfolgte mit dem abpipettierten, karbolisierten Zentrifugat; die Tiere vertrugen Injektionen von Meconium viel besser, als Injektionen von Kot. Die erste Injektionsdosis betrug 4 ccm; in Intervallen von 4—5 Tagen wurden steigende Dosen injiziert; nach 6—8 Injektionen — 8 Tage nach der letzten Injektion — wurde bei dem behandelten Kaninchen ein Aderlaß vorgenommen. Zum Versuch wurde  $1\frac{1}{2}$  ccm der Extraktverdünnung und 0,5—1 ccm Serum verwendet. Vorversuche mit 0,1, 0,5, 1,0 Serum bei verschiedenen Extraktmengen ergeben als Optimum



der Reaktion 1 ccm Serum und  $1\frac{1}{2}$  ccm des Extraktes. Die Beobachtungszeit dauerte 2 Stunden Bruttofen und 20 Stunden Zimmertemperatur, weil nicht in allen Röhrchen die Reaktion gleichzeitig eintrat.

Die erste Frage, ob Meconiumpräzipitin zu erhalten ist, können wir in bejahendem Sinne beantworten. Es gelang uns zwar, ein Serum zu bekommen, das mit Meconiumextrakt Niederschlag gab, die Spezifität war jedoch insofern eingeschränkt, als Meconiumserum auch mit Dünndarminhaltextrakt Niederschläge gab; ein quantitativer Unterschied war nicht vorhanden. Mit Säuglingskot gab das Serum, wenn auch nicht immer und nicht in der gleichen Stärke, Niederschläge. Mit Menschenserum waren Spuren von Niederschlägen zuweilen nach 24 Stunden aufgetreten. Mit Menschenkot von Erwachsenen dagegen reagierte Meconiumserum fast negativ. Zugleich wurde das Meconium mit verschiedenen anderen Darminhaltpräzipitinen versetzt, und zwar mit Dünndarm-, Dickdarm-, Menschenkot (Erwachsene), Säuglingskot und gemischtem Kotserum (Kot entnommen 3 Tage nach der Geburt). Die Reziprozität der Reaktion war nicht vorhanden. Meconiumextrakt gibt keine Niederschläge mit den oben genannten Seris (mit wenigen Ausnahmen, wo eine Andeutung von Präzipitation zu beobachten war), das gemischte Kotpräzipitin ausgenommen (Tabelle Ia und Ib). Eine Erklärung für dieses Verhalten können wir vorderhand nicht geben. Eine spezifische Hemmung seitens der Gallenbestandteile wäre schwer anzunehmen; wenn wir dies annehmen wollten, wäre nicht zu erklären, warum Meconiumserum mit Meconiumextrakt, warum Dünndarminhaltextrakt mit Meconiumserum Niederschläge erzeugt.

Die Substanz, die das Immunserum hervorzurufen imstande war, könnte von den Darmepithelien stammen. Dafür würde die positive Reaktion von Meconiumserum mit Dünndarminhaltextrakt sprechen. Jedoch daß es nicht die Darmepithelien als solche sind, die als Antigene wirken, können wir aus folgenden Gründen behaupten. Wie Brezina und Ranzi an Tieren, Wilenko am Menschen in ihren Untersuchungen gezeigt haben, reagiert Kotextrakt mit Dünndarmimmunserum.

1\*

Tabelle Ia.

Extrakte verwendete Menge 1 $\frac{1}{2}$ ccm	Meconiumserum die verwendete Menge 1,0 ccm	Dünndarmserum verwendete Menge 1,0 ccm	Säuglingskotserum verwendete Menge 1,0 ccm	Gemischt. Kotserum verwendete Menge 0,1 ccm	Dickdarmserum verwendete Menge 1,0 ccm	Menschenkot- (Er- wachsenen-) serum 1,0 ccm	Menschen- Immunserum verw. Menge 0,1 u. 1,0 ccm	Kontrolle mit 1,0 ccm normalem Kaninchenserum
1) Meconium frisch entnommen								
a) Verdünnung 1:10	+ Niederschlag stark	+ Nied. stark	{ + neg.	{ + neg.	neg.	neg.	neg.	klar
b) „ 1:20								
c) „ 1:40								
2) Meconium 7 Stunden alt								
Verdünnung 1:10	{ diffuse Trübung							
„ 1:20		neg.	neg.	Trübg.	neg.	neg.	neg.	klar
„ 1:40								
3) Meconium 18 Stunden alt								
Verdünnung 1:10	diff. Trüb.	neg.	neg.	Trübg.	neg.	neg.	neg.	klar <sup>1)</sup>
4) Inhalt aus dem Dünndarm eines toten Kindes								
Verdünnung 1:10	{ st. Nied.							
„ 1:20		neg.	Spur.	Nied.	—	neg.	neg.	klar
„ 1:40								
5) Meconium frisch								
Verdünnung 1:10	st. Nied.	neg.	neg.	—	—	—	neg.	klar
6) Meconium 36 Stunden alt								
Verdünnung 1:10	st. Nied.	neg.	neg.	Nied.	neg.	Spur	neg.	klar
7) Meconium frisch								
Verdünnung 1:10	st. Nied.	+ Spur.						
„ 1:20		neg.	neg.	Nied.	neg.	neg.	neg.	klar
„ 1:40		neg.						
8) Meconium 24 Stunden alt								
Verdünnung 1:10	Nied.	Trübg.	—	Nied.	Trübg.	Trübg.	neg.	klar
9) Meconium frisch entnommen								
Verdünnung 1:10	st. Nied.	neg.	—	Nied.	neg.	neg.	neg.	klar
10) Meconium 7 Stunden alt	st. Nied.	neg.	—	Nied.	neg.	{ Spur Nied.	neg.	klar
11) Meconium frisch								
Verdünnung 1:10	st. Nied.	{ kaum Spur.	—	—	Spur	Spur	Spur	klar
12) Meconium 12 Stunden alt								
Verdünnung 1:5	st. Nied.	neg.	—	—	neg.	neg.	neg.	klar
13) Meconium 24 Stunden alt								
Verdünnung 1:5	Nied.	neg.	—	—	neg.	Spur	neg.	klar
14) Meconium 15 Stunden alt								
Verdünnung 1:5	st. Nied.	neg.	—	—	neg.	neg.	neg.	klar
15) Meconium frisch								
Verdünnung 1:5	Nied.	neg.	—	—	neg.	neg.	neg.	klar
16) Meconium frisch								
Verdünnung 1:5	st. Nied.	neg.	—	—	neg.	neg.	neg.	klar

1) Anmerkung: Kontrolle mit altem Menschenserum starker Niederschlag.

Tabelle I b.

Extrakte verwendete Menge 1 $\frac{1}{2}$ ccm	Meconiumserum verwendete Menge 1,0 ccm	Säuglingskots- erum verwendete Menge 1,0 ccm	Dünndarmserum verwendete Menge 1,0 ccm	Dickdarmserum ver- wendete Menge 1,0 ccm	Menschenkot- (Erwach- senen-) serum verwend. Menge 1,0 ccm	Menschen- serum- Immunserum verwend. Menge 1,0 ccm	Kontrolle normales Kaninchenserum ver- wendete Menge 1,0 ccm
<b>I. Säuglingskot- extrakt.</b>							
1) Säuglingskot 10 Tage Verdünnung 1:10 1:20	deutl. Sp. Spuren	} Nied.	—	—	—	—	klar <sup>1)</sup>
2) Säuglingskot (2 Monate) Verdünnung 1:10	Nied.	st. Nied.	—	—	—	—	klar
3) Kot (6 Wochen) Verdünnung 1:10	Nied.	st. Nied.	Nied.	—	—	—	klar
4) Säuglingskot (10 Tage) Verdünnung 1:10	Nied.	Nied.	Nied.	—	—	—	klar
5) Kot (6 Tage) Verdünnung 1:10 1:20 1:40	Spuren negativ negativ	} Nied.	—	—	—	—	klar
6) Kot (5 Tage) Verdünnung 1:20 1:40	+ dtl. Sp. deutl. Sp.	} Nied.	—	—	—	—	klar
7) Kot (6 Tage) Verdünnung 1:20	Nied.	st. Nied.	—	—	—	—	klar
8) Kot (5 Tage) Verdünnung 1: 5 } 1:10 }	negativ	Nied.	—	—	—	—	klar
<b>II. Dünndarminhalt- extrakt.</b>							
1) Verdünnung 1: 10 } 1: 20 } 1: 40 } 1: 80 } 1:160 }	Nied.	deutliche Spuren	—	—	—	—	klar
2) Verdünnung 1:20 } 1:40 }	Nied.	deutliche Spuren	—	—	—	—	klar
3) Verdünnung 1:20	Nied.	Nied.	—	—	—	—	klar
4) Verdünnung 1:20 } 1:40 }	Nied.	deutliche Spuren	—	—	—	—	klar

1) Anmerkung: Mit gemischtem Kotserum Niederschlag.

Tabelle II.

Extrakte Stuhl verwendete Menge 1½ ccm	Meconium- serum verwendete Menge 1,0	Säuglingskotserum verwendete Menge 1,0	Gemischtes Kot- serum verwendete Menge 1,0	Menschen- serum verwendete Menge 0,1 u. 1,0	Kontrolle Kaninchenserum normal 1,0
<b>I. Fall (Hajek)</b>					
Meconium 12 Stunden alt Verdünnung bis 1:160	starker Niederschlag	negativ	Nieder- schlag	negativ	klar
Stuhl von demselben Kind 3 Tage nach der Geburt Verdünnung bis 1:160	deutliche Spuren	Nieder- schlag	Nieder- schlag	kaum Spuren	klar
5 Tage nach der Geburt entnommen Verdünnung 1:10 1:20 1:40 1:80	Spuren negativ	Nieder- schlag	Nieder- schlag	negativ	klar
<b>II. Fall (Klepke)</b>					
Stuhl 7 Stunden alt Verdünnung bis 1:160	starker Niederschlag	Spuren bis 1:40	Nieder- schlag	negativ	klar
2 Tage alt bis 1:80 1:160	Nied. deutl. Spuren	Nied. bis 1:60	Nieder- schlag	negativ	klar
3 Tage alt Verdünnung bis 1:160	deutl. Nied. bis 1:40 dann Spuren	Nieder- schlag	Nieder- schlag	Spur	klar
<b>III. Fall (Malidusa)</b>					
Stuhl 12 Stunden alt Verdünnung bis 1:80	Niederschlag	negativ	Nied. schlag	Spur negativ	klar
Stuhl über 48 Stunden alt Verdünnung bis 1:160	deutl. Nied. bis 1:80	deutliche Spuren	Nieder- schlag		klar
Stuhl 5 Tage alt 1:20 1:40	Niederschlag	st. Nieder- schlag	Nieder- schlag	Spur	klar
<b>IV. Fall (Hartmann)</b>					
Frisches Meconium Verdünnung bis 1:80	Niederschlag stark	negativ	Nieder- schlag	—	klar
Stuhl 48 Stunden alt	deutl. Nied. bis 1:30 Spuren 1:60	deutliche Spuren	st. Nieder- schlag	—	klar
Stuhl 4 Tage alt	deutl. Nied. bis 1:30	Nieder- schlag	Nieder- schlag	—	klar
Stuhl 6 Tage alt	deutl. Nied. bis 1:10 Spuren in wei- teren Ver- dünnungen	Nieder- schlag	Nieder- schlag	negativ	klar

Anmerkung: Mit 1,0 Kotserum Erwachsener war die Reaktion negativ.

Extrakte Stuhl verwendete Menge 1½, ccm	Meconium- serum verwendete Menge 1,0	Säuglingskotserum verwendete Menge 1,0	Kot- serum verwendete Menge 1,0	Menschen- serum verwendete Menge 0,1 u. 1,0	Kontrolle Kaninchenserum normal 1,0
<b>V. Fall</b>					
Meconium 12 Stunden alt	Nied. stark bis 1:60	kaum Sp. bis 1:20	Nieder- schlag	—	klar
Meconium 36 Stunden alt Verdünnung bis 1:30	Niederschlag	kaum Spuren	Nieder- schlag	—	—
Stuhl 3 Tage alt Verdünnung bis 1:30	Niederschlag	Nieder- schlag	Nieder- schlag	Spuren	klar
Stuhl 4 Tage alt Verdünnung bis 1:30	Niederschlag	Nieder- schlag	Nieder- schlag	—	klar
Stuhl 6 Tage alt	negativ	Nied.	Nied.	—	klar

Dieses Verhalten schließt die Identität des Meconiumserums mit Dünndarminhaltserum aus. Es bleiben nun die Meconiumkörperchen, die nach dem Ausfall der Millonschen Reaktion beurteilt, eine eiweißartige Substanz als Kern haben. Diese Substanz stammt nach manchen Autoren aus veränderten Darmepithelien. Es liegt nahe, die Vermutung auszusprechen, daß diese Substanz antigenartig wirkt. Die vielleicht im Sinne Obermayers und Picks veränderten Darmepithelien bewirken ein verschiedenes Verhalten des Meconiumserums und Dünndarmserums gegen Menschenkot.

In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob der Stuhlinhalt, entnommen bei demselben Individuum an verschiedenen Tagen nach der Geburt, eine Veränderung der biologischen Reaktion zeigt. Wie die Tabelle II zeigt, reagiert frisches Meconium stets positiv mit Meconiumserum und negativ mit anderen Seris. Vom dritten Tage an beginnt die Reaktion des Kotextraktes mit Meconiumserum schwächer zu werden; sie reicht nicht bis zu den Verdünnungen des frischen Meconiums und reagiert in späteren Tagen zuweilen sogar negativ. Ein entgegengesetztes Verhalten ist gegen Säuglingskotserum zu beobachten; die anfangs negative Reaktion wird von Tag zu Tag stärker (Tabelle II).

Säuglingskot, den wir in mehreren Fällen gegen verschiedene Darmsera geprüft haben, verhält sich wie Kot Erwachsener, nur mit dem Unterschiede, daß es verschieden auf Meconiumserum reagiert. Säuglingskot mit Meconiumserum gibt eine Reaktion, während Kot Erwachsener mit Meconiumserum keine Reaktion auslöst.

#### Zusammenfassung.

1) Meconiumserum gibt Niederschläge ohne quantitative Unterschiede mit Meconiumextrakt und Dünndarminhaltextrakt, eine schwächere oder spurenweise Reaktion besteht gegen Säuglingskot und Menschenserum. Menschenkot Erwachsener reagiert auf Meconiumserum nicht.

2) Meconiumextrakt gibt Niederschläge nur mit Meconiumpräzipitin, nicht dagegen mit anderen Darmpräzipitinen.

3) Stuhl, entnommen bei demselben Individuum in verschiedenen Zeitabschnitten nach der Geburt, ändert seine Reaktion in dem Sinne, daß der Inhalt, der in den ersten zwei Tagen nur mit Meconiumserum reagiert, nicht aber mit Säuglingskot, vom dritten Tage die Reaktion ändert. Die Reaktion mit Säuglingskotserum wird immer stärker, mit Meconiumserum immer schwächer.

#### Literatur.

- 1) Zweifel, Arch. f. Gynäkol., Bd. 7, 1875, p. 474:
- 2) Förster, Wiener med. Wochenschr., 1858, No. 37.
- 3) Brezina und Ranzi, Wiener klin. Wochenschr., No. 44.
- 4) Wilenko, Wiener klin. Wochenschr., No. 48.
- 5) Schmidt und Strassburger, Untersuchungen der Faeces.



*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. Dr. R. Paltauf.]

### **Ueber Meningokokkenserum <sup>1)</sup>.**

Von Prof. R. Kraus und Dr. St. Baecher.

(Eingegangen bei der Redaktion am 9. Juni 1909.)

#### **Einleitung.**

Die günstigen Heilresultate, welche mit dem Meningokokkenserum von verschiedener Seite verzeichnet werden, machen es wahrscheinlich, daß demselben eine spezifische Heilwirkung zuzuschreiben sein dürfte.

Wie aus den statistischen Zusammenstellungen verschiedener Autoren (Flexner, Wassermann) hervorgeht, vermag das Serum bei intraspinaler Anwendung die Mortalität um die Hälfte und mehr noch herabzusetzen <sup>2)</sup>. Daß auf Grund dieser Erfahrungen die klinische Medizin das Meningokokkenserum in den Arzneischatz aufnehmen dürfte, ist wohl nicht zu bezweifeln.

Daher erscheint es dringend notwendig, den Mechanismus der spezifischen Serumwirkung zu ergründen, den wirksamen Körper des Serums einer quantitativen Analyse zugänglich zu

---

1) Vortrag, gehalten am 3. Juni 1909 in der Sitzung der freien mikrobiologischen Vereinigung in Wien.

2) Auch die Erfahrungen, welche in den Wiener Kinderspitälern mit unserem Serum seit 3 Jahren gemacht wurden, sprechen für die günstige Wirkung des Serums. Nach Jehles Erfahrungen im St. Annen-Kinderspitale (Escherich) sank die Mortalität der behandelten Fälle (41) auf 45 Proz., während die der unbehandelten 70—80 Proz. betrug. Eder-Weiss berichtet aus dem Carolinen-Kinderspital (Knoepfelmacher) über eine Mortalität der behandelten Fälle (40) von 35 Proz., dagegen von 85 Proz. bei unbehandelten (20) Fällen. Foltanek hat im Jahre 1907 19 Fälle mit Serum behandelt, davon sind 14 geheilt, 5 gestorben, von 13 unbehandelten Fällen sind 10 gestorben, 3 geheilt. Im Jahre 1908 wurden 15 Fälle mit Serum behandelt, davon sind 9 geheilt, 6 gestorben. Im Jahre 1909 3 Fälle mit Serum geheilt. Im ganzen

22 Fälle ohne Serum 8 geheilt, 14 gestorben (63 Proz.)

37 „ mit „ 26 „ 11 „ (29 „ )

machen, wenn man diese Therapie vom subjektiven Ermessen des Einzelnen freimachen soll und sie vor Zufällen der Empirie bewahren will.

Der Mechanismus der Serumwirkung ist nicht ganz klar gestellt, und eine allgemein anerkannte Methode der Wertbemessung dieses Serums besitzen wir nicht.

Diese Fragen bilden den Gegenstand der seit 3 Jahren fortgesetzten Untersuchungen, deren Ergebnisse von Kraus in Gemeinschaft mit Doerr bereits kurz mitgeteilt wurden, und über die hier ausführlich berichtet werden soll.

Jochmann hat als erster ein Meningokokkenserum hergestellt und auch die Wirksamkeit desselben im Experiment festzustellen versucht. Diese Versuche, sowie die späteren von Ruppel, Flexner sollten die antiinfektiösen Eigenschaften des Serums an mit lebenden Meningokokken infizierten Meerschweinchen erweisen.

Die Erfahrung dieser Autoren und vieler anderer (Kutscher, Ghon) hat aber gelehrt, daß die Pathogenität der Meningokokken und deren Virulenz derart inkonstant ist, daß die Prüfung der Sera mittels lebender Kultur vielen Ungenauigkeiten unterliegt und an der Inkonstanz der Virulenz scheitert. Die gewöhnlichen Versuchstiere wie Meerschweinchen, Mäuse, Kaninchen sind zwar für Meningokokken, namentlich junge Meerschweinchen, empfänglich, aber so inkonstant, daß eine systematische Anwendung unmöglich erscheint. Auch wir haben versucht, diese Art der Prüfung durchzuführen und mußten sie aus den angegebenen Gründen aufgeben.

Die Versuche Flexners, welchem es gelungen ist, bei niederen Affen durch spinale Injektion Meningitis zu erzeugen und sie mit Serum günstig zu beeinflussen, sind wegen der Kostspieligkeit zur methodischen Serumprüfung nicht geeignet. Immerhin sind diese Versuche an Affen äußerst wertvoll, weil sie die natürliche Infektion nachahmen und die Heilwirkung des Serums experimentell begründen.

#### **Ueber Komplementbindung mit Meningokokkenserum.**

In Ermangelung einer brauchbaren tierexperimentellen Wertbemessung haben Wassermann und Kolle vorgeschlagen, das Komplementbindungsvermögen des Serums nach Bordet-

Gengou als Maß der Wirksamkeit anzusehen. In der ersten Mitteilung von Kraus und Doerr wurde gegen diese Prüfung Stellung genommen und diese als Prüfungsart für kurative Sera abgelehnt. Die Versuche von Moreschi und Haendel, Neufeld, Uhlenhuth, Krumbein und Schattilof und anderen zeigen, daß die komplementbindende Eigenschaft mit den Ambozeptoren der Sera nicht in Zusammenhang gebracht werden darf. Wie eigene darauf gerichtete Versuche, welche Baecher und Laub mit Dysenterie- und Diphtherieserum ausgeführt haben, lehren, sind es auch nicht die Antitoxine, welche die Komplementbindung ausmachen. Welche Natur also diesen spezifisch komplementbindenden Körpern zukommen dürfte, ist bis heute nicht entschieden.

Sollte es zulässig sein, auf dem Nachweis von Körpern unbekannter Wirksamkeit eine Wertbemessung eines Heilserums aufzubauen? Schon aus diesem Grunde stehen wir auch heute auf dem Standpunkt, daß die Wertbemessung nach Wassermann und Kollé allein den Anforderungen einer exakten Prüfung nicht entspricht.

Durch unsere Versuche konnten wir die Angaben von Kollé und Wassermann, Krumbein und Schattilof bestätigen, insofern als Meningokokkenserum mit Extrakten von Meningokokken eine spezifische Komplementablenkung gibt. Aber so wie die Agglutination nicht mit jedem Meningokokkenstamm gelingt (selbst bei erhöhter Temperatur), so ist auch für die Komplementbindung nicht jeder Stamm geeignet (wie es die folgende Tabelle I lehrt). Dies war der Grund, warum in der ersten

Tabelle I.

Hämolytisches System: 0,004 Amboz. + 0,05 Kompl. + 2,0 gew. Hammelblut 5-proz.

Serum	Stamm	VIII		X		T		Triest		Worb		Schmidt	
	Dosis	0,01	0,005	0,02	0,015	0,05	0,025	0,05	0,025	0,05	0,025	0,05	0,025
Kolle	0,01	p. H.	H.	p. H.	p. H.	θ	H.	θ	θ	θ	p. H.	p. H.	H.
	0,005	p. H.	H.	p. H.	p. H.	θ	H.	θ	θ	θ	p. H.	p. H.	H.
	0,002	p. H.	H.	p. H.	H.	θ	H.	θ	θ	θ	H.	H.	H.
Mustang	0,01	p. H.	H.	p. H.	p. H.	θ	H.	θ	θ	θ	p. H.	p. H.	H.
	0,005	p. H.	H.	p. H.	p. H.	θ	H.	θ	θ	θ	p. H.	p. H.	H.
	0,002	H.	H.	p. H.	p. H.	θ	H.	θ	θ	θ	p. H.	H.	H.
Kontrollen Laura (Typhus)	0,1	H.	H.	p. H.	p. H.	p. H.	H.	p. H.	p. H.	H.	H.	p. H.	H.
	0,05	H.	H.	p. H.	p. H.	H.	H.	p. H.	p. H.	H.	H.	H.	H.
	0,02	H.	H.	p. H.	p. H.	H.	H.	p. H.	p. H.	H.	H.	H.	H.

Mitteilung von Kraus und Doerr mit dem Meningokokkenserum keine stärkere Komplementbindung nachgewiesen werden konnte, als sie dem normalen Serum zukommt. Erst als wir verschiedene Stämme zu diesen Versuchen herangezogen haben, bekamen wir spezifische Bindungswerte mit dem Meningokokkenserum. Interessant ist außerdem die Beobachtung (welche in Tabelle II zu konstatieren ist), daß

Tabelle II.

		Worb		X	
		0,02	0,01	0,02	0,01
Kolle	0,03	Sp. H.	Sp. H.	f. k. H.	f. k. H.
	0,02	Sp. H.	Sp. H.	f. k. H.	f. k. H.
	0,01	Sp. H.	Sp. H.	f. k. H.	f. k. H.
Höchst	0,03	Sp. H.	Sp. H.	H.	H.
	0,02	Sp. H.	Sp. H.	H.	H.
	0,01	Sp. H.	Sp. H.	H.	H.
Mustang	0,03	Sp. H.	Sp. H.	ø	ø
	0,02	Sp. H.	Sp. H.	ø	ø
	0,01	Sp. H.	Sp. H.	Sp. H.	p. H.
Lorenz	0,03	Sp. H.	Sp. H.	Sp. H.	Sp. H.
	0,02	Sp. H.	Sp. H.	p. H.	p. H.
	0,01	Sp. H.	Sp. H.	f. k. H.	f. k. H.
Kontrollen Laura } (Typhus)	0,03	H.	H.	H.	f. k. H.
	0,02	H.	H.	H.	H.
	0,01	H.	H.	H.	H.
Janus }	0,03	H.	H.	H.	H.
	0,02	H.	H.	H.	H.
	0,01	H.	H.	H.	H.

Sp. H. = Spur Hämolyse, H. = Hämolyse, f. k. H. = fast komplette Hämolyse, p. H. = partielle Hämolyse.

einzelne Stämme mit bestimmten Seris sehr starke Ablenkung gaben, mit anderen Seris aber, welche mit einem anderen Stamm gleich wirksam waren, fast gar keine. Der Stamm Worb gibt mit dem Serum Kolle, Höchst und unserem Serum Mustang, Lorenz Komplementbindung, mit dem Stamm X bloß das Serum Mustang und Lorenz. Zu bemerken wäre, daß der Stamm X zur Immunisierung unserer Sera mitverwendet wurde, wogegen

der Stamm Worb uns durch die Freundlichkeit des Herrn Dr. Krumbein (Kolles Institut) überlassen wurde.

Es scheint, als ob hier eine Vielheit der komplementbindenden Körper im Serum vorhanden sein dürfte, abhängig von dem Antigen, welches diese Körper hervorruft. Die verschiedenen Meningokokkenstämme dürften sich diesbezüglich verschieden verhalten, und davon wird auch die verschiedene komplementbindende Eigenschaft des Serums abhängig sein.

Auch die agglutinierenden Eigenschaften des Meningokokkenserums hängen von dem Stamm ab, mit welchem das Serum gewonnen wurde, und sowie nicht alle Stämme als komplementbindend sich erweisen, lassen sie sich auch nicht alle gleich agglutinieren.

Tabelle III.

Agglutination 2 Stunden bei 55° (nach 24 Stunden bei 37° abgelesen).

Stamm		VIII	X	Worb	Neufeld	Triest	T
Bouillon	0,5	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Laura (Typhus)	1/20	θ	θ	θ	θ	θ	θ
	1/60	θ	θ	θ	θ	θ	θ
	1/100	θ	θ	θ	θ	θ	θ
Lorenz	1/20	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.
	1/60	"	"	"	"	"	"
	1/100	"	"	"	"	"	"
Mustang	1/20	"	"	"	"	"	"
	1/60	"	"	"	"	"	"
	1/100	"	"	θ	"	θ	p.Aggl.
Kolle	1/20	θ	θ	Aggl.	"	Aggl.	Aggl.
	1/60	θ	θ	"	"	"	"
	1/100	θ	θ	"	"	"	"
Ruppel (agglutinierend)	1/20	θ	θ	θ	"	θ	"
	1/60	θ	θ	θ	"	θ	"
	1/100	θ	θ	θ	"	θ	"

Wie aus der Tabelle III hervorgeht, agglutiniert das Serum Kolle die Stämme VIII, X nicht, wohl aber den Stamm Worb, der wahrscheinlich zur Immunisierung verwendet wurde. Serum „Mustang“, „Lorenz“ agglutiniert beide Stämme VIII, X, die zur Immunisierung benutzt wurden.

**Ueber Gifte der Meningokokken und giftneutralisierende  
Eigenschaften des Meningokokkenserums.**

Wir haben gesehen, daß die Pathogenität der Meningokokken für eine methodische Wertbemessung nicht herangezogen werden dürfte, und daß die spezifischen komplementbindenden Eigenschaften des Serums allein kein Maß für dessen Heilwert bilden.

Unsere Bestrebungen gingen zunächst dahin, die Gifte der Meningokokken zu studieren, um eventuell mit den gewonnenen Giften ein giftneutralisierendes Serum darzustellen und dieses messen zu können. Ueber diese Versuche haben Kraus und Doerr bereits in Kürze berichtet.

Flexner hat aus toluolisierten Kochsalzsuspensionen von Agarkulturen des *Diplococcus intracellularis* mittels Filtration durch Berkefeldfilter toxische Körper gewonnen, welche sich für Meerschweinchen (125 g) in Mengen von 0,5—1 ccm giftig erwiesen hatten.

Auch v. Lingelsheim und Leuchs finden in Filtraten aus 3-wöchentlichen Bouillonkulturen Gifte, welche in Mengen von 0,25—3,0 ccm Meerschweinchen töten.

Nach dem Referate von Ghon hat auch Oehlmacher in Traubenzuckerbouillon mit Kreidezusatz Gifte gewinnen können.

Eigene Versuche haben gelehrt, daß man aus Agarkulturen verschiedener Stämme<sup>1)</sup> mit destilliertem Wasser oder  $n_{10}$  Sodalösung Gifte gewinnen kann, welche in Mengen von 0,5 ccm und weniger Meerschweinchen, Mäuse und auch Kaninchen töten. Die Meningokokkenstämme werden in Agarflaschen geimpft und die Kultur nach 24—48 Stunden mit 10 ccm  $n_{10}$  Sodalösung aufgeschwemmt, mit 0,5 Proz. Karbolsäure oder mit Toluol versetzt und 24 Stunden bei niedriger Temperatur stehen gelassen. Nachher wird entweder durch Papier filtriert oder scharf zentrifugiert, um eine womöglich bakterienfreie klare Flüssigkeit zu gewinnen.

1) Die Versuche, welche in der ersten Arbeit von Kraus und Doerr mitgeteilt sind, wurden mit anderen Stämmen fortgesetzt und ergaben gleiche Resultate.



Meerschweinchen und Mäuse eignen sich zur Giftprüfung besser als Kaninchen.

Junge Meerschweinchen finden wir, sowie Flexner, am giftempfindlichsten, wenn Gift peritoneal injiziert wird. Nach 6—8 Stunden sind die Tiere krank und gehen nach 12 bis 24 Stunden zugrunde. Außer Rötung der Darmserosa, Hyperämie der Nebennieren, etwas fadenziehendem Exsudat finden sich keine weiteren Veränderungen vor.

Seitdem wir statt des destillierten Wassers zur Extraktion  $n/_{10}$  Sodalösung benutzen, bekommen wir bessere Gifte. Die giftigen Körper sind äußerst labil, so daß längerdauernde Versuche mit ein und demselben Gift unmöglich sind. Trotz Aufbewahrung der Gifte bei niederen Temperaturen und Lichtabschluß verändern sich dieselben in kurzer Zeit.

Auch aus verschiedenaltigen Bouillonkulturen gelang es, Gifte nachzuweisen, welche in Mengen von 0,5—2 ccm für Meerschweinchen wirksam waren. Wir haben verschiedenaltige Bouillonkulturen auf ihre Giftigkeit geprüft, und fanden 6—20-tägige Kulturen giftig. Es wurden entweder Filtrate verwendet oder karbolisierte (0,5 Proz.) Kulturen.

Trotz zahlreicher Versuche mit verschiedenen alkalisierten flüssigen Nährböden, trotz Serumzusatz und Verwendung verschiedener Stämme haben wir keine konstanten Resultate gewonnen, so daß wir für die Giftgewinnung die Agarkulturen vorziehen.

Krumbein und Diehl bestätigen im Prinzip unsere Befunde, indem es auch ihnen gelungen ist, aus Agarkulturen Gifte für Meerschweinchen und Mäuse zu gewinnen. Diese Autoren ziehen die Emulsion den Extrakten insofern vor, als sie mit den ersteren konstantere Resultate und auch scheinbar haltbarere Präparate erhielten.

Nach den oben angeführten eigenen Versuchen ist es als sichergestellt anzunehmen, daß in den Leibern der Meningokokken giftige Körper enthalten sind, welche mittelst destillierten Wassers oder  $n/_{10}$  Sodalösung extrahierbar sind. Ob diese Gifte mit den Krankheitserscheinungen in Beziehung gebracht werden dürfen und ob in vivo Gifte sezerniert werden, sind Fragen, die nicht entschieden werden können.

Wir möchten nur darauf hinweisen, daß auch beim *Cholera vibrio* gelöste Gifte in Bouillonkulturen schwer nachweisbar sind, daß sich nur endogene Gifte sicher darstellen lassen, und doch muß man auf Grund der Versuche von Kraus eine Giftsekretion *in vivo* annehmen, die ohne Zerfall der Leiber die Vergiftungserscheinungen bedingt.

Die nächste Aufgabe bestand darin, diese Gifte auf ihren antigenen Charakter hin zu prüfen und giftneutralisierende Sera zu gewinnen.

Zu diesen Versuchen haben wir zunächst Ziegen verwendet, welche mit Agarextrakten subkutan vorbehandelt werden. Die intravenöse Immunisierung der Tiere scheitert meist daran, daß man bei dieser Art der Behandlung Erscheinungen der Anaphylaxie, welche auch zum Tode führen, nicht zu verhüten vermag. Die Serumprüfung wurde an jungen Meerschweinchen durchgeführt. Es wurde die sicher tödliche Giftdosis mittels peritonealer Injektion ermittelt und diese oder die 2-fach tödliche Dosis mit abfallenden Serummengen *in vitro* gemischt, dann peritoneal injiziert. Zur Kontrolle wurde Gift allein und Gift mit Serum normaler Tiere injiziert. Die folgenden Versuche (1—8) zeigen, daß das Serum von Ziegen, die durch längere Zeit mit Extrakten von Meningokokken vorbehandelt wurden, imstande ist, die 1—2-fach tödliche Giftdosis der Meningokokkenextrakte zu neutralisieren. Allerdings sind die neutralisierenden Serumwerte nicht hoch, selten höher als 0,1 und 0,05 ccm. Gewöhnlich finden wir die Sera der Ziegen in Mengen von 0,5—0,2 ccm wirksam und diese Werte steigen nicht, trotz monatelanger Weiterbehandlung mit wirksamen Giften. Daß wir es mit spezifischen Werten zu tun haben, lehren die stets gleichzeitig angestellten Kontrollen mit normalem Ziegenserum oder mit Serum von Tieren, die anderweitige Antigene erhielten. Gewöhnlich erwiesen sich diese Sera in Mengen von 1,0 ccm, selbst nach längerer Einwirkung *in vitro* unwirksam, nur manchmal fanden sich normale Sera, welche giftneutralisierend wirkten. Auch Flexner macht auf diese giftneutralisierende Eigenschaft normaler Sera aufmerksam.

Immerhin können wir aber auf Grund der quantitativen Auswertung behaupten, daß normale Sera in Mengen von 0,2—0,5 ccm die Gifte nicht zu neutralisieren vermochten, was die Immunsera ja imstande sind. Daß die Serumwerte nicht hoch sind, ist eine Tatsache, die gegen die Spezifität des Serums nicht spricht, wie einzelne Autoren anzunehmen geneigt wären. Wir wissen, daß auch die Sera, gewonnen mit Dysenterie, Typhus, Choleragiften, trotz längerer Immunisierung keine hohen Werte erlangen und nicht in Analogie zu setzen sind mit den Diphtherie- und Tetanusantitoxinen. (Siehe Referate: Paltauf und Calmette, XIV. intern. hyg. Kongreß, Berlin 1907.)

#### Versuche mit Serum vorbehandelter Ziegen.

##### 1. Versuch am 15. Dez.

0,5 ccm	Ziegenser.	29	+	2,0 ccm	Gift	perit. M.	703	lebt
0,3 "	"	29	+	2,0 "	"	" "	702	+ 2 Tag.
0,05 "	"	29	+	2,0 "	"	" "	714	+ 1 "
1,0 "	norm. Ziegenser.		+	2,0 "	"	" "	704	lebt
0,5 "	"	"	+	2,0 "	"	" "	706	+ 1 Tag.
				2,0 "	"	" "	711	+ 1 "
				1,0 "	"	" "	701	+ 1 "

##### 2. Versuch am 2. März.

0,5 ccm	Ziegenser.	11	+	2,0 ccm	Gift	perit. M.	914	lebt
0,1 "	"	11	+	2,0 "	"	" "	919	+ 1 Tag.
0,05 "	"	11	+	2,0 "	"	" "	925	+ 1 "
0,5 "	"	10	+	2,0 "	"	" "	924	lebt
0,1 "	"	10	+	2,0 "	"	" "	922	+ 2 Tag.
0,05 "	"	10	+	2,0 "	"	" "	920	+ 3 "
0,5 "	norm. Ziegenser.		+	2,0 "	"	" "	844	+ 5 Std.
0,1 "	"	"	+	2,0 "	"	" "	917	+ 2 Tag.
0,05 "	"	"	+	2,0 "	"	" "	916	+ 2 "
				2,0 "	"	" "	921	+ 2 "

##### 3. Versuch am 24. Mai.

0,5 ccm	Ziegenser.	29	+	2,0 ccm	Gift	perit. M.	282	lebt
0,1 "	"	29	+	2,0 "	"	" "	250	lebt
2,0 "	norm. Ziegenser.		+	2,0 "	"	" "	285	+ 1 Tag.
				1,0 "	"	" "	153	+ 1 "

##### 4. Versuch am 25. Mai.

0,5 ccm	Ziegenser.	11	+	2,0 ccm	Gift	perit. M.	10	lebt
0,1 "	"	11	+	2,0 "	"	" "	14	+ 2 Tag.
0,5 "	"	29	+	2,0 "	"	" "	29	lebt
0,1 "	"	29	+	2,0 "	"	" "	8	lebt
2,0 "	norm. Ziegenser.	II	+	2,0 "	"	" "	16	+ 1 Tag.
0,5 "	"	II	+	2,0 "	"	" "	7	+ 1 "

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. III.

## 5. Versuch am 22. April.

0,1	ccm	Ziegenser.	29	+	4,0	ccm	Gift	perit.	M.	29	lebt
0,05	"	"	29	+	4,0	"	"	"	"	261	lebt
0,1	"	norm.	Ziegenser.	+	4,0	"	"	"	"	252	+ 1 Tag.
0,05	"	"	"	+	4,0	"	"	"	"	140	+ 1 "

## 6. Versuch am 9. Juni.

0,5	ccm	Ziegenser.	29	+	2,0	ccm	Gift B	perit.	M.	364	lebt
0,2	"	"	29	+	2,0	"	"	"	"	270	lebt
1,0	"	"	11	+	2,0	"	"	"	"	16	lebt
0,5	"	"	11	+	2,0	"	"	"	"	110	+ 6 Std.
1,0	"	norm.	Ziegenser. I	+	2,0	"	"	"	"	408	+ 1 Tag.
1,0	"	"	II	+	2,0	"	"	"	"	406	+ 1 "
1,0	"	"	III	+	2,0	"	"	"	"	43	+ 3 "
0,5	"	"	III	+	2,0	"	"	"	"	57	+ 1 "

## 7. Versuch am 9. Juni.

1,0	ccm	Ziegenser.	29	+	2,0	ccm	Gift A	perit.	M.	61	lebt
0,5	"	"	29	+	2,0	"	"	"	"	94	lebt
0,2	"	"	29	+	2,0	"	"	"	"	87	+ 6 Std.
1,0	"	"	11	+	2,0	"	"	"	"	42	lebt
0,5	"	"	11	+	2,0	"	"	"	"	58	lebt
1,0	"	norm.	Ziegenser. I	+	2,0	"	"	"	"	11	+ 2 Tag.
1,0	"	"	II	+	2,0	"	"	"	"	55	lebt
				+	2,0	"	"	"	"	238	+ 6 Std.

## 8. Versuch am 21. Juni.

0,5	ccm	Ziegenser.	29	+	3,0	ccm	Gift A	perit.	M.	96	lebt
0,3	"	"	29	+	3,0	"	"	"	"	93	+ 1 Tag.
0,1	"	"	29	+	3,0	"	"	"	"	90	+ 2 "
1,0	"	norm.	Ziegenser. I	+	3,0	"	"	"	"	107	+ 1 "
1,0	"	"	II	+	3,0	"	"	"	"	174	+ 1 "
0,5	"	"	II	+	3,0	"	"	"	"	91	+ 5 Std.
				+	3,0	"	"	"	"	92	+ 1 Tag.
										94	+ 1 "

Diese Versuche lehren also, daß im Serum von mit Meningokokkengiften vorbehandelten Ziegen spezifische giftneutralisierende Körper nachweisbar sind. Es war weiter wichtig, auch Pferde in dieser Richtung zu den Versuchen heranzuziehen. Die Pferde wurden zum Teil subkutan, zum Teil intravenös vorbehandelt und deren Serum in gleicher Weise wie das Serum der Ziegen geprüft.

## Versuche mit Serum vorbehandelter Pferde.

## 1. Versuch am 22. April.

0,1	ccm	Ser. Kl.		+	4,0	ccm	Gift	perit.	M.	272	lebt
0,01	"	"		+	4,0	"	"	"	"	269	lebt
0,1	"	norm.	Pferdeser. I	+	4,0	"	"	"	"	270	+ 1 Tag.
0,1	"	"	II	+	4,0	"	"	"	"	153	+ 1 "

## 2. Versuch am 12. Dez.

0,5 ccm Ser. L.	+ 2,0 ccm Gift perit. M.	677	lebt
0,1 " " "	+ 2,0 " " " "	684	lebt
0,5 " norm. Pferdeser.	+ 2,0 " " " "	687	+ 2 Tag.
0,1 " " "	+ 2,0 " " " "	675	+ 1 "

## 3. Versuch am 13. Dez.

0,5 ccm Ser. L.	+ 2,0 ccm Gift perit. M.	688	lebt
0,1 " " "	+ 2,0 " " " "	623	lebt
0,5 " norm. Pferdeser.	+ 2,0 " " " "	692	+ 1 Tag.

## 4. Versuch am 10. Juli.

1,0 ccm Ser. L.	+ 1,0 ccm Gift perit. M.	93	lebt
0,5 " " "	+ 1,0 " " " "	98	lebt
0,1 " " "	+ 1,0 " " " "	99	lebt
1,0 " norm. Pferdeser.	+ 1,0 " " " "	104	+ 1 Tag.
0,5 " " "	+ 1,0 " " " "	92	+ 5 Std.

## 5. Versuch am 15. Jan.

1,0 ccm Ser. L.	+ 2,0 ccm Gift perit. M.	439	lebt
0,5 " " "	+ 2,0 " " " "	445	+ 3 Tag.
0,1 " " "	+ 2,0 " " " "	442	+ 2 "
1,0 " norm. Pferdeser.	+ 2,0 " " " "	438	+ 2 "
0,5 " " "	+ 2,0 " " " "	435	+ 2 "
0,1 " " "	+ 2,0 " " " "	441	+ 2 "
	1,5 " " " "	434	+ 2 "
	1,0 " " " "	378	+ 1 "
	0,5 " " " "	379	lebt

## 6. Versuch am 13. Sept.

1,0 ccm Ser. M.	+ 1,0 ccm Gift perit. M.	251	lebt
0,5 " " "	+ 1,0 " " " "	239	+ 2 Tag.
0,1 " " "	+ 1,0 " " " "	248	+ 1 "
1,0 " norm. Pferdeser.	+ 1,0 " " " "	252	+ 1 "
0,5 " " "	+ 1,0 " " " "	245	+ 1 "
	1,0 " " " "	250	+ 1 "
	0,5 " " " "	145	+ 1 "

## 7. Versuch am 14. Sept.

0,5 ccm Ser. M.	+ 1,0 ccm Gift perit. M.	255	lebt
0,2 " " "	+ 1,0 " " " "	258	+ 3 Tag.
0,5 " norm. Pferdeser.	+ 1,0 " " " "	253	+ 1 "
0,2 " " "	+ 1,0 " " " "	257	+ 1 "

## 8. Versuch am 24. Nov.

1,0 ccm Ser. M.	+ 1,0 ccm Gift perit. M.	340	lebt
1,0 " norm. Pferdeser.	+ 1,0 " " " "	643	+ 1 Tag.
	1,0 " " " "	528	+ 2 "

## 9. Versuch am 25. Nov.

1,0 ccm Ser. M.	+ 1,5 ccm Gift perit. M.	630	lebt
1,0 " norm. Pferdeser.	+ 1,5 " " " "	647	+ 1 Tag.
	1,5 " " " "	562	+ 1 "

2\*

## 10. Versuch am 23. Nov.

1,0 ccm Ser. M.	+ 1,0 ccm Gift perit. M.	565 lebt
0,3 " " "	+ 1,0 " " " "	510 + 1 Tag.
1,0 " norm. Pferdeser.	+ 1,0 " " " "	666 + 1 "
	1,0 " " " "	651 + 1 "
		641 + 1 "

## 11. Versuch.

0,5 ccm Ser. M.	+ 1,5 ccm Gift perit. M.	254 + 2 Tag.
0,3 " " "	+ 1,5 " " " "	304 + 1 "
0,5 " " "	+ 0,5 " " " "	300 lebt "
0,3 " " "	+ 0,5 " " " "	298 + 3 "
0,5 " Ser. L.	+ 1,0 " " " "	303 + 1 "
0,3 " " "	+ 1,0 " " " "	296 + 2 "
0,5 " " "	+ 0,5 " " " "	297 lebt "
0,3 " " "	+ 0,5 " " " "	299 lebt "
1,0 " norm. Pferdeser.	+ 1,0 " " " "	241 + 1 "
0,5 " " "	+ 1,0 " " " "	295 + 1 "
1,0 " " "	+ 0,5 " " " "	255 + 1 "
0,5 " " "	+ 0,5 " " " "	301 + 2 "
	2,0 " " " "	+ nach einigen Std.
	1,0 " " " "	294 + 1 Tag.
	0,5 " " " "	302 + 1 "
	0,3 " " " "	+ 2 "

Das Serum der vorbehandelten Pferde ist imstande, die 1 bis 2-fache Giftdosis in Mengen von 1—0,5 ccm zu neutralisieren, was für gewöhnlich mit Serum normaler oder andersartig vorbehandelter Pferde (Dysenterie, Tetanus, Typhus) nicht gelingt. Auch hier konstatieren wir wieder die Tatsache, daß trotz längerer Vorbehandlung mit den Meningokokkengiften die Werte der Pferdesera nicht steigen. Da aber das Pferdeserum nicht vorbehandelter Tiere in gleichen Mengen sich als unwirksam erwiesen hat, so ist wohl diese giftneutralisierende Fähigkeit des Serums auf spezifische Körper zurückzuführen.

Ob das Gift aller Stämme von einem Serum, gewonnen mit bestimmten Stämmen, neutralisiert werden kann, oder ob diese Sera nur bestimmte Gifte neutralisieren, haben wir bisher nicht entscheiden können. Krumbein und Diehl wollen solche Unterschiede mit abgetöteten Meningokokken konstatieren haben.

Daß im Serum mit Meningokokkenextrakten vorbehandelter Tiere spezifisch giftneutralisierende Körper auftreten, konnten Krumbein und Diehl bei Nachprüfungen bestätigen. In ihrer Arbeit sagen die Autoren, daß antiendotoxische Eigenschaften dem Meningokokkenserum zukommen, und daß diese bei der Heilung der Krankheit eine Rolle spielen.

Nur bezüglich der Auswertung, meinen Krumbein und Diehl, ist die Prüfung auf giftneutralisierende Eigenschaften praktisch nicht brauchbar, da sie bei Meerschweinchen inkonstante Resultate erhielten. Es ist sicher richtig, daß die Prüfung des Meningokokkenserums auf giftneutralisierende Eigenschaften an Meerschweinchen nicht so sichere Resultate liefert wie die Auswertung der Diphtherie- und Tetanusantitoxine. Auch bei der Prüfung der giftneutralisierenden Eigenschaften des Typhusserums begegnet man dieser Schwierigkeit. Dies mag wohl zum Teil daran liegen, daß die giftneutralisierenden Eigenschaften der Sera nur geringe sind, außerdem daran, daß man nicht immer klare bakterienfreie Extrakte, die leicht neutralisierbar sind, zu Versuchen verwendet und an der stark variierenden Giftempfindlichkeit der Tiere. In den Versuchen von Krumbein und Diehl dürfte außerdem die Verwendung größerer Meerschweinchen, 150—180 g, die Differenzen erklären. Krumbein und Diehl haben auf die Heranziehung von jungen Meerschweinchen vom Gewichte 125 g, wie wir und Flexner sie benutzt haben, von vornherein verzichtet, da ihnen „derartige Meerschweinchenembryonen“ zu diesen Versuchen ungeeignet erschienen. Daß mit diesem Argumente Tatsachen nicht bekämpft werden dürfen, braucht nicht erst diskutiert zu werden. Unsere hier mitgeteilten zahlreichen Versuche zeigen, daß gerade durch Verwendung der jungen Meerschweinchen, die 3—4 Wochen alt sind, bei entsprechenden Kontrollen brauchbare Resultate gewonnen werden können.

Krumbein und Diehl haben auch Mäuse zu ihren Serumversuchen herangezogen. Wir haben einige Versuche an Mäusen ausgeführt und müssen wegen der noch größeren Inkonstanz der Resultate die Verwendung junger Meerschweinchen vorziehen. Auch Dopter bestätigt in einer kurzen Mitteilung (C. r. d. l. Soc. biol., 1909) unsere Resultate, meint aber, daß einem Serum, welches durch Immunisierung mit Meningokokken gewonnen ist, bessere giftneutralisierende Eigenschaften zukommen als dem, welches bloß mit Extrakten gewonnen wurde. Wir möchten nur bemerken, daß Dopter nur Sera von zwei Pferden zur Verfügung gestanden haben und daß die Differenz vielleicht bloß durch das individuelle Verhalten des einen Pferdes zu erklären



ist. Es wäre ganz unverständlich, warum diese Verschiedenheiten vorhanden sein sollten.

### Ueber bakteriotrope Eigenschaften des Meningokokkenserums.

Die Tatsache, daß das Meningokokkenserum bakteriotrop wirkt, hat bereits Jochmann ermittelt, es gelang ihm nicht nur in vitro diesen Nachweis zu erbringen, sondern auch im Peritoneum des Meerschweinchens. Erst aber durch Neufelds systematische Versuche ist gezeigt worden, daß spezifisch bakteriotrope Wirkungen dem Meningokokkenserum konstant zukommen und daß das Serum in starken Verdünnungen diese Eigenschaften aufweist. Auf Grund dieser Versuche schlägt Neufeld vor, die bakteriotrope Eigenschaft des Serums methodisch zur Prüfung der Sera heranzuziehen.

Nachdem wir uns in einigen Versuchen überzeugt hatten, daß dem Meningokokkenserum keinerlei bakterizide Eigenschaften zukommen, und auch durch Zusatz von Serum normaler Meerschweinchen oder Peritonealexudat keine bakterizide Wirkung des Meningokokkenserums zutage tritt (s. Versuch I bis V), gingen wir daran, die Versuche nach Neufeld zu wiederholen.

#### I. Bakterizider Versuch. 9. XI. 1908.

Meningokokken St. Triest (24<sup>h</sup> Agarkultur, Verdünnungen mit Bouillon derart, daß 0,2 derselben =  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{400}$ ,  $\frac{1}{10000}$  und  $\frac{1}{250000}$  der Kultur).

Sera: Mustang 22. IX. 1908 Immuns Serum } inakt.  
 Drusus 11. VIII. 1908 (Diphtherieser. als Kontrollser. } Pferdeser.  
 Frisches Meerschweinchenserum (Komplement).  
 Erhitztes Meerschweinchenserum.

0,2 Bakt. + 0,2 Pferdeserum, + 0,2 Meerschweinchenserum  $\frac{1}{2}$ ,<sup>b</sup> in vitro gemischt, dann mit 45° Agar zu Platten ausgegossen.

0,2 Bakt.	+ 0,2 Mustang + 0,2 Kompl.	+ 0,2 Drusus + 0,2 Kompl.	+ 0,2 Mustang + 0,2 erh. Mschw.-Ser.	+ 0,2 erh. Mschw.-Ser. + 0,2 Komplement	+ 0,4 Bouill.	Kontrolle der Medien ohne Bakterien	
= $\frac{1}{25}$ Kultur	∞	∞	∞	∞	∞	Mustang	steril
= $\frac{1}{400}$	∞	∞	∞	∞	∞	Drusus	"
= $\frac{1}{10000}$	zahlreich	zahlreich	steril	einzel	zahlr.	Komplement	"
= $\frac{1}{250000}$	"	einzel	einzel	"	"	erhitztes Mschw.-Ser.	"

## II. Bakterizider Versuch. 11. XI. 1908.

Meningokokken St. X. 48<sup>b</sup> Agarkultur. Verdünnungen mit Bouillon derart, daß 0,2 derselben =  $\frac{1}{30}$  und  $\frac{1}{400}$  Kultur.

Sera: Mustang } 22. IX. 1908 Drusus (Diphtherie) } 11. VIII. 1908  
 Lorenz } Immunsera Genius (Tetanus) } Kontrollsera.  
 Verdünnungen mit Bouillon ad 0,2 enthaltend 0,2, 0,05 u. 0,01 Serum.  
 Komplement, akt. fr. Meersch.-Ser. } Verdünnungen mit Bouillon  
 Inaktiviertes ( $60^{\circ} \frac{1}{2}^h$ ) „ „ } ad 0,1, enthalt. 0,1 u. 0,05 Ser.

0,2 Bakt. + 0,2 Pferdeserum-Verdünnung resp. Bouillon + 0,1 Meerschweinchenserum-Verdünnung in vitro  $2\frac{1}{2}^h$ , dann Ausstriche je 1 Oese (=  $\frac{1}{6000}$  und  $\frac{1}{100\ 000}$  Kultur auf Agarplatten).

0,2 Bakt. +	Bouillon	—	—	—	—	—	—	—	0,2	0,3
	inakt. Mschw.-Ser.	—	—	—	0,05	0,05	0,05	0,1	—	—
	Komplement	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05	0,05	—	0,1	—
	Pferdeserum	0,2	0,05	0,01	0,2	0,05	0,01	0,2	—	—
0,2 Bakt. = $\frac{1}{30}$ Kultur	Mustang	zahr.	$\infty$	zahr.	$\infty$	$\infty$	zahr.	zahr.	$\infty$	$\infty$
	Lorenz	$\infty$	$\infty$	„	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$		
	Drusus	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$		
	Genius	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$		
0,2 Bakt. = $\frac{1}{400}$ Kultur	Mustang	zahr.	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	zahr.	$\infty$	$\infty$	$\infty$
	Lorenz	„	$\infty$	$\infty$	zahr.	$\infty$	„	zahr.		
	Drusus	$\infty$	$\infty$	$\infty$	„	$\infty$	„	„		
	Genius	zahr.	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$		

## III. Bakterizider Versuch. 14. XI. 1908.

Meningokokken St. X. 24<sup>b</sup> Agarkultur, Bouillonverdünnung ad 0,2 =  $\frac{1}{6000}$  Kultur.

Sera: Mustang } 22. IX. 1908 Immunsera  
 Lorenz }  
 Drusus (Diphtherie), 11. VIII. 1908 Kontrollserum.  
 Serumverdünnung mit Bouillon ad 0,2 = 0,2, 0,05 und 0,01 Serum.  
 Aktives frisches Meersch.-Ser. (Kompl.) } Verdünn. mit Bouillon  
 Inaktives „ „ } ad 0,1 = 0,1 u. 0,05 Ser.

0,2 Bakt. + 0,2 Pferdeserum resp. Bouillon + 0,1 Meerschweinchenserum resp. Bouillon in vitro gemischt nach verschiedenen Zeiten 1 Oese Ausstrich auf Agarplatten.

Aus- saat	Bouillon inakt. Mischw.-Ser. Komplement Pferdeserum	—	—	—	—	—	—	—	0,2	0,2	0,2
		—	—	—	0,05	0,05	0,05	0,1	—	0,05	0,1
		0,1	0,1	0,1	0,05	0,05	0,05	—	0,1	0,05	—
		0,2	0,05	0,01	0,2	0,05	0,01	0,2	—	—	—
nach 20'	Mustang Lorenz Drusus	Ueberall gleichmäßig zahlreiche konfluierende Kolonien									
nach 1 <sup>h</sup>	Mustang Lorenz Drusus										
nach 2 <sup>h</sup>	Mustang Lorenz Drusus										

## IV. Bakterizider Versuch (Peritoneallymphe). 15. XII. 1908.

Meningokokken Stamm X. 24<sup>h</sup> Agarkultur in 5 ccm Bouillon aufgeschwemmt. Peritoneallymphe: Exsudat (von Meerschweinchen 12<sup>h</sup> nach Injektion von 10 ccm Bouillon-Kochsalz intraperitoneal) + 1,5-proz. Citratlösung  $\bar{a}\bar{a}$  zentrifugiert, frisch oder  $\frac{1}{2}$  h bei 60° inaktiviert.

Bakt. + 1,5 Peritoneallymphe + Bouillon ad 2,5 in vitro gemischt, nach verschiedenen Zeiten je 2 Oesen Ausstrich auf Agarplatten.

Zeit der Aussaat	+ 1,5 frische Lymphe		+ 1,5 erhitzte Lymphe		+ Bouillon (allein)
	nach 45'	nach 3 <sup>h</sup>	nach 45'	nach 3 <sup>h</sup>	sofort
1,0 Bakt.	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$
0,3 "	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$
0,1 "	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$
0,03 "	sehr zahlr.	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$
0,01 "	zahlr.	sehr zahlr.	$\infty$	sehr zahlr.	zahlr.

Peritoneallymphe (allein): steril.

## V. Bakterizider Versuch (Exsudat). 5. I. 1909.

- I. Meningokokken Stamm X. 24<sup>h</sup> Agarkultur in 5 ccm Bouillon aufgeschwemmt.
- II. Sera: Mustang 25. XII. 1908 Immunserum; Luitpold 21. XI. 1908 (Diphtherie) Kontrollserum).
- III. Exsudat (5<sup>h</sup> nach Injektion von je 10 ccm Bouillon-Kochsalz Meerschweinchen intraperitoneal + 1,5-proz. Citrat  $\bar{a}\bar{a}$ ). Die eine Hälfte unverändert = Exsudat.  
Die andere Hälfte zentrifugiert: a) abpipettierte Flüssigkeit = Peritoneallymphe; b) Sediment (2mal mit physiologischer Lösung gewaschen, dann im ursprünglichen Volumen Bouillon-Citratgemisch aufgeschwemmt) = Leukocyten.  
Frisches normales Meerschweinchenserum (1:4 Bouillon-Citratgemisch) = Komplement.  
Bouillon-Citratgemisch  $\bar{a}\bar{a}$ .

Bakterien (Bouillon ad 0,3) + 0,2 Pferdeserum resp. Bouillon + 1,2 Exsudat (resp. Peritoneallymphe, Leukocyten, Komplement, Bouilloncitrat oder Bouillon) + 0,3 Bouillon in vitro gemischt, nach verschiedenen Zeiten je 2 große Oesen Ausstriche auf Agarplatten.

Aus- saat	+ ...	0,3 Bakt.-Aufschw. + ...						0,03 Bakt.-Aufschw. + ...					
		Exsudat	Periton.- Lymphe	Leuko- cyten	Komple- ment	Citrat- bouillon	Bouillon	Exsudat	Periton.- Lymphe	Leuko- cyten	Komple- ment	Citrat- bouillon	Bouillon
nach 45'	0,2 Mustang	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	∞	sehr zahlr.	∞	sehr zahlr.	zahlr.	zahlr.	∞	∞	∞
	0,2 Luitpold	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	sehr zahlr.	∞	∞	∞
	0,2 Bouillon	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	wenig zahlr.?	∞
nach 2 <sup>h</sup>	0,2 Mustang	sehr zahlr.	sehr zahlr.	zahlr.	sehr zahlr.	∞	∞	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	sehr zahlr.	∞	∞
	0,2 Luitpold	∞	∞	sehr zahlr.	∞	∞	∞	sehr zahlr.	sehr zahlr.	∞	∞	∞	∞
	0,2 Bouillon	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
Kontrollen (ohne Bakterien)		steril	steril	steril	steril	steril		Mustang: steril, Luitpold: steril					

Die von Neufeld angegebene Methode der Feststellung der Bakteriotropine in den Verdünnungen der Sera ist leicht auszuführen (s. folgende Versuche), verlangt nicht die mühselige Auszählung der phagocytierten Bakterien (nach Wright), die überdies ungenau ist, so daß gegen ihre methodische Verwendung zur Prüfung des Meningokokkenserums nichts einzuwenden wäre. Unsere Versuche ergeben, daß dem Meningokokkenserum zweifellos eine bakteriotrope Wirksamkeit zuzuschreiben ist. Es wird aber noch notwendig sein, daß man, wie es Neufeld vorschlägt, ein Standardserum<sup>1)</sup> vorrätig hält, um daran die Werte der anderen Sera und auch die Phagocytierbarkeit der Kulturen messen zu können. Jedenfalls scheint uns, daß durch den Nachweis der giftneutralisierenden Eigenschaften des Meningokokkenserums und auch durch die von Neufeld ausgearbeitete Methode des Nachweises der Bakteriotropine eine Basis ge-

1) Es wird auch notwendig sein, sich über Höhe der Serumverdünnung, Menge der Bakterien zu einigen.

schaffen ist, auf welcher man zu einer allgemein anerkannten Wertbestimmung des Serums gelangen dürfte.

I. Opsoninversuch. 29. IX. 1908.

Meningokokken Stamm VIII. (1 Oese von 24<sup>h</sup> Agarkultur in 2 ccm physiologischer Lösung aufgeschwemmt, durch 3' zentrifugiert, nicht erhitzt.

Meerschweinchen-Leukocyten aus Peritonealexsudat (6<sup>h</sup> nach Injektion von 10 ccm Bouillon + physiologischer Lösung aa intraperitoneal), in 1,5% Citrat, dann 2mal in physiologischer Lösung gewaschen.

Serumverdünnungen mit physiologischer Lösung, 1:10 und 1:100.

Mustang	} Meningokokkenserum	Genius (Tetanus)	} Kontrollsera
Lorenz		Karl (Typhus)	
		Drusus (Diphtherie)	

Sera sämtl. vom 11. VIII. 1908.

Technik (Wright—Neufeld): in Wrights Melangeure 1. Teil Leukocyten + 1 Teil Bakterien + 1 Teil altes erhitztes normales Meerschweinchen Serum + 1 Teil Pferdeserum verdünnt, resp. physiologische Lösung — 20' bei 37°, Ausstriche; Färbung nach Leishman.

Serum	Verdünnung 1:10		Verdünnung 1:100	
	Phagocytose	sonstige Beobachtungen	Phagocytose	sonstige Beobachtungen
Lorenz	+++ (ca. 60 %) Leukocyten	vergrößerte, schlecht gefärbte, deformierte Phagocyten Haufenbildung der Leukocyten Agglutination	++ (ca. 20 %)	spärliche, meist deformierte Leukocyten
Mustang	++ (ca. 20 %)	spärliche Leukocyten, nur in den Leukocytenhaufen starke Phagocytose Agglutination	+	starke Haufenbildung der Leukocyten in dieser Phagocytose
Kontrolle Genius	0 (> 1%)	Besser erhaltene Leukocyten, teilweise in Haufen, in diesen einzelne Phagocyten, gut isolierte und gefärbte Kokken	+	keine Agglutination
Karl	+	deformierte Leukocyten, wenige Haufen	+	spärliche Leukocyten, in den Haufen mäßige Phagocytose
Drusus	0	teilweise schwer veränderte Leukocyten in großen Haufen	0	starke Haufenbildung
phys. Lsg.	+	teilweise gut erhaltene Leukocyten mit starker Haufenbildung, nur in diesen Phagocytose		

II. Opsoninversuch 13. X. 1908.  
Meningokokken Stamm VIII (1 Oese : 2 cem), nicht erhitzt. Normale und Immunsra verschiedener Aderlässe,  
Verdünnung  $\frac{1}{10}$ , Technik wie in den vorhergehenden Versuchen. (L. = Leukocyten, K. = Kokken.)

Normale (Kontroll-)Sera (phys. Lösung)			Immunsra verschiedener Aderlässe					
Serum	Phagocyt.	Bemerkung	Serum	Phagocyt.	Bemerkung	Serum	Phagocyt.	Bemerkung
Leutnant 25. II. 08 (Dysenterie)	fast $\emptyset$	L.: etwas vergrößert, doch gut begrenzt K.: massenhaft frei	Meningokok- Serum I 26. II. 07	fast $\emptyset$	L.: intakt K.: auch zahlreich frei	Klara I	+	L.: intakt K.: zahlreich frei
Genius 11. VIII. 08 (Tetanus)	fast $\emptyset$	L.: intakt K.: massenhaft frei	Lorenz 22. X. 07	$\emptyset$	L.: etwas blasser K.: zahlreich frei	Mustang 2. XII. 07	+	L.: intakt K.: zahlreich frei
Karl 11. VIII. 08 (Typhus)	$\emptyset$	L.: intakt K.: massenhaft frei	Lorenz 17. II. 08	$\emptyset$	L.: nicht ganz intakt K.: zahlreich frei	Mustang 14. I. 08	+	L.: intakt K.: zahlreich frei
Drusus 11. VIII. 08 (Diphtherie)	$\emptyset$	L.: teilweise blaß gefärbt K.: massenhaft frei	Lorenz 8. IV. 08	+	L.: intakt K.: zahlreich frei	Mustang 25. I. 08	fast $\emptyset$	L.: intakt K.: zahlreich frei
Nabob 11. VIII. 08 (Diphtherie)	$\emptyset$	L.: intakt K.: massenhaft frei	Lorenz 30. VI. 08	+	L.: intakt K.: zahlreich frei	Mustang 30. VI. 08	++	L.: intakt, teilweise in Haufen K.: auch frei
Laura 11. VIII. 08 (Typhus)	$\emptyset$	L.: spärlich vergrößert, doch gut begrenzt, blasser K.: massenhaft frei	Lorenz 11. VIII. 08	++	L.: intakt K.: zahlreich frei	Mustang 11. VIII. 08	++	L.: intakt K.: zahlreich frei
phys. Lösung	fast $\emptyset$	L.: intakt K.: massenhaft frei	Lorenz 22. IX. 08	++	L.: intakt K.: auch frei, teilw. agglutiniert	Mustang 22. IX. 08	++	L.: intakt K.: auch frei, teilw. agglutiniert

Prüfung auf Schädigung der Leukocyten durch Pferdeserum nach Neisser-Wechsberg: 0,5 Leukocyten (+ 0,5 Bakt.  
+ 0,5 erh. Meerschweinchen Serum) + 0,5 physiologischer Lösung oder Pferdeserum (Verdünnung  $\frac{1}{10}$ ), reduzieren 2 gtt.  
Methylenblaulösung in ganz gleicher Weise.

## III. Opsoninversuch.

Meningokokken Stamm Neufeld. 24<sup>h</sup> Agarkultur (2 Oesen auf 2 ccm physiologische Lösung).

Menschenleukocyten aus Menschenblut dreimal gewaschen (1,5-proz. Citrat, dann physiologische Lösung).

Sera verdünnt mit physiologischer Lösung  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{1000}$  ( $\frac{1}{10000}$ ).

Technik nach Wright: 1 Teil Blutsediment + 1 Teil Bakt. + 1 Teil Serum gemischt, dann 1<sup>h</sup> bei 37°. Ausstriche auf Objektträger. Färbung: Manson.

Verdünnung	Mustang 29. I.	Lorenz 29. I.	Bern	Mylight	Leutnant	Drusus
$\frac{1}{10}$	mäßig stark <sup>1)</sup>	mäßig stark <sup>1)</sup>	mäßig stark <sup>1)</sup>	sehr schwach	schwach	schwach
$\frac{1}{100}$	schwach	schwach doch deutlich	schwach <sup>1)</sup>	fast $\emptyset$	sehr schwach	fast $\emptyset$
$\frac{1}{1000}$	schwach	schwach doch deutlich	sehr schwach	sehr schwach	$\emptyset$	$\emptyset$
$\frac{1}{10000}$	sehr schwach	schwach	$\emptyset$			

## IV. Opsoninversuch.

Meningokokken Stamm Neufeld. 24<sup>h</sup> Agarkultur (4 Oesen auf 2 ccm physiol. Lösg.).

Meerschweinchenleukocyten aus Peritonealexsudat (5<sup>h</sup> nach Inj. von 10 ccm [Bouillon und physiol. Lösg. aa] intraperiton.), 3mal gewaschen (zuerst in 1,5 Citrat, dann in physiol. Lösg.).

Serumverdünnungen mit physiol. Lösg.  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{100}$ ,  $\frac{1}{1000}$ ,  $\frac{1}{10000}$ .

Technik: Mischung in Wrights Melangeuren 1 Teil Leukoc. + 1 Teil Bakterienaufschwemmung + 1 Teil Serum, 1<sup>h</sup> bei 37°. Ausstriche mit Oese auf Objektträger. Färbung: Manson.

Verdünnung	Mustang 29. Jan.	Lorenz 29. Jan.	Bern	Mylight	Leutnant	Drusus
$\frac{1}{10}$	sehr stark <sup>2)</sup>	sehr stark <sup>2)</sup>	ziemlich stark, sehr ungleich <sup>2)</sup>	schwach	mäßig stark	schwach
$\frac{1}{100}$	zieml. stark	stark	ziemlich stark <sup>2)</sup>	sehr schwach	schwach, doch deutlich	schwach
$\frac{1}{1000}$	mäßig stark	schwach	schwach doch deutlich	fast $\emptyset$	schwach, doch deutlich	fast $\emptyset$
$\frac{1}{10000}$	schwächer, doch sehr deutlich	schwach	schwach, doch deutlich			

1) Starke Haufenbildung der Kokken (Agglutination).

2) Agglutinat.

## V. Opsoninversuch.

Technik: Neufeld-Wright.

Bakterienaufschwemmung: 2 Oesen von 24<sup>h</sup> Agarkultur, Stamm Worb in 2 ccm physiologischer Lösung.

Serumverdünnungen: 1:10, 1:100, 1:1000 mit physiologischer Lösung.

Sera: Mustang 15. III. } Meningokokkenserum  
 Lorenz 15. III. }  
 Janus 15. III. (Typhus) } Kontrollserum.  
 Klar 15. III. (Dysenterie) }

Leukocyten vom Meerschweinchen aus Peritonealexsudat. 5<sup>h</sup> nach Injektion von 10 ccm Bouillon-Kochsalzlösung aa in 1,5 Citrat, dann 3mal gewaschen.

In Melangeuren 1 Teil Leukocyt. + 1 Teil Bakt. + 1 Teil Serum (verdünnt) gemischt, 1/<sub>2</sub> bei 37° wiederholt gemischt, Ausstriche mit Oese. Färbung: Leihsmann.

Verdünnung	Mustang	Lorenz	Janus	Klar
1/ <sub>10</sub>	sehr schwach <sup>1)</sup>	sehr schwach <sup>1)</sup>	sehr schwach	sehr schwach
1/ <sub>100</sub>	sehr schwach	sehr schwach	" "	" "
1/ <sub>1000</sub>	" "	" "	" "	" "

Im Anschluß an die vitro-Versuche Neufelds haben wir die bakteriotropen Eigenschaften des Serums auch in vivo nachzuweisen und sie zu messen versucht.

Das Prinzip der von uns ausgearbeiteten Methode beruht darauf, festzustellen, ob eine bestimmte zählbare Menge der Meningokokkenkultur, welche ins Peritoneum der Meerschweinchen mit verschiedenen Serummengen injiziert wird, nach verschiedenen Zeiten dem Peritoneum entnommen, auf der Agarplatte eine deutliche Abnahme der Keime konstatieren läßt.

Der Versuch gestaltet sich folgendermaßen:

Gesunden Meerschweinchen (150 g) werden bestimmte Mengen einer 24-stündigen Meningokokkenagarkultur peritoneal injiziert und nach 1—8—12 Stunden mittels Isaeffscher Kapillaren der Inhalt entnommen und 2 Tropfen auf Agarplatten gebracht. Diejenige kleinste Menge der Kultur, welche noch zahlreiche, aber isolierte Kolonien nach 8—12 Stunden ergibt, wird als Testdosis für den eigentlichen Versuch genommen. Nachdem dieser Vorversuch gemacht ist, wird die bestimmte Kulturmenge mit abfallenden Mengen des Meningokokkenserums und normalem Serum gemischt peritoneal injiziert. Nach verschiedenen Zeiten wird dieser Inhalt entnommen und auf Agarplatten gebracht.

1) Agglutination.



## 1. Versuch.

M.	Bakterien	Serum	Entnahme nach			Verlauf
			4 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	
964	Stamm Triest 1,0 ccm	0,2 Bouillon	∞	∞	∞	† 2 Tag.
957		0,2 Typhusser.	∞	∞	∅	
947		0,2 Ser. Lor.	∅	einzelne	∅	
818		0,2 Ser. Must.	∅	∅	∅	
308	Stamm Neufeld 1,0 ccm	0,2 Bouillon	zahlr.	wenig		† 1 Tag.
887		0,2 Typhusser.	∞	∅		† 1 Tag.
768		0,2 Ser. Lor.	∅	∅		
876		0,2 Ser. Must.	einzelne	∅		

## 2. Versuch.

M.	Bakterien	Serum	Entnahme nach			Verlauf
			3 <sup>h</sup>	5 <sup>h</sup>	7 <sup>h</sup>	
439	Stamm Neufeld 1,5 ccm	0,2 Bouillon	∞	∞	∅	
939		0,05 Typhusser.	∞	∞	∞	
968		0,2 "	wenig zahlr.	einzelne	∅	
801		0,05 Ser. Lor.	∞	"	∅	
912		0,2 " "	zahlreich	"	∅	
986		0,05 " Must.	∞	sehr zahlr.	∅	
903		0,2 " "	sehr zahlr.	∅	∅	

## 3. Versuch.

M.	Stamm	Serum	Entnahme nach			Verlauf
			3 <sup>h</sup>	7 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	
764	VIII 2 ccm	0,5 Bouillon	sehr spärlich	∅	∅	† 2 Tag.
753		0,1 Typhusser.	∞	∞	∅	
761		0,5 "	∞	∞	∅	
759		0,1 Ser. Must.	zahlreich	spärlich	∅	
756		0,5 " "	spärlich	∅	∅	

## 4. Versuch.

M.	Stamm	Serum	Entnahme nach			Verlauf
			1 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup>	8 <sup>h</sup>	
631	X 1,5 ccm	0,5 Bouillon	zahlreich	zahlreich	—	† 4 <sup>h</sup>
510		0,5 n. Pferdeser.	"	"	zahlr.	† 1 Tag.
642		0,1 "	"	"	"	† 8 <sup>h</sup>
553		0,5 Ser. Must.	sehr spärlich	∅	∅	
506		0,1 " "	zahlreich	spärlich	spärlich	† 8 <sup>h</sup>
448		0,5 " Lor.	"	zahlreich	"	† 8 <sup>h</sup>
603		0,1 " "	"	"	"	† 1 Tag.
481		0,5 " Bern	"	"	zahlr.	† 1 Tag.
632		0,1 " "	"	"	"	† 8 <sup>h</sup>
651		0,5 " Höchst	spärlich	spärlich	∅	
567		0,1 " "	zahlreich	zahlreich	zahlr.	† 8 <sup>h</sup>

## 5. Versuch.

M.	Stamm	Serum	Entnahme nach				Verlauf
			20'	1 <sup>h</sup>	7 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	
438	VIII	0,1 NS.	∞	∞	∞	einzelne	
436		0,5 NS.	∞	∞	∞	θ	
440		0,1 Ser. Lor.	∞	zahlreich	θ	einzelne	
451		0,5 " "	∞	"	spärlich	"	
407		—	∞	∞	∞	∞	

Mittels dieser Methode läßt sich nachweisen, daß dem Meningokokkenserum in Verdünnungen, in welchen normales Serum unwirksam ist, auch in vivo antiinfektiöse Eigenschaften zukommen. Nachdem wir in früheren Versuchen uns davon überzeugt hatten, daß dem Meningokokkenserum selbst mit Peritonealexsudat keine bakteriziden Eigenschaften zukommen, das entnommene Exsudat in gefärbten Präparaten starke Phagocytose dort aufweist, wo bei späterer Entnahme die Agarkultur sterile Platten oder Keimabnahme zeigt, ist nicht zu bezweifeln, daß die Wirkung des Serums auch in vivo auf Bakteriotropine zurückzuführen sein dürfte. So wie Neufeld fanden auch wir, daß verschiedene Stämme verschiedene Phagocyrierbarkeit nicht nur in vitro, sondern auch in vivo zeigen, und daß manche Stämme für diese Versuche geeigneter sind als andere. Wichtig ist für derlei Versuche zu wissen, daß Keimabnahme nicht nur mit Meningokokkenserum, sondern auch mit normalem Serum und auch mit Bouillon im Peritoneum der Meerschweinchen erreicht werden könne. Der Unterschied gegenüber der Wirkung des Meningokokkenserums ist aber durch Berücksichtigung quantitativer und zeitlicher Verhältnisse nachweisbar.

## Zusammenfassung.

1) Die Meningokokken sind in ihrer Pathogenität und Virulenz für Meerschweinchen, Kaninchen und Mäuse inkonstant. Man kann deswegen die Pathogenität der lebenden Kultur zur Prüfung des Meningokokkenserums auf seine antiinfektiöse Wirkung nicht verwenden.

2) Die komplementbindenden Eigenschaften des Meningokokkenserums sind kein Maß für die antiinfektiösen Eigenschaften desselben. Die Prüfung des Meningokokkenserums nach Kolle und Wassermann allein läßt daher kein Urteil über dessen Heilwert zu.

3) Aus den Kulturen des *Meningococcus intrac.* lassen sich Gifte gewinnen, welche junge Meerschweinchen innerhalb 24 Stunden töten.

4) Das mit diesen Giften gewonnene Serum hat spezifisch neutralisierende Eigenschaften.

5) Die Werte dieser giftneutralisierenden Sera sind nicht groß. In Anbetracht ihrer Spezifität aber muß man diese giftneutralisierende Eigenschaft doch auf besondere Antikörper beziehen.

6) Die Prüfung des Serums auf seine giftneutralisierenden Eigenschaften geschieht am besten mittels peritonealer Injektion an jungen Meerschweinchen.

7) Im Meningokokkenserum lassen sich außerdem nach der Methode von Neufeld spezifische bakteriotrope Körper nachweisen.

8) Auch mittels peritonealer Versuche an Meerschweinchen lassen sich im Meningokokkenserum Bakteriotropine nachweisen.

9) Die zukünftige Prüfungsmethode des Meningokokkenserums muß auf dem Nachweis der giftneutralisierenden Eigenschaften des Serums oder auf dem Nachweis der Bakteriotropine nach Neufeld oder in vivo aufgebaut sein.

10) Die günstigen Heilerfolge, welche nach lumbaler Injektion des Serums bei cerebrospinaler Meningitis beobachtet werden, sind durch die nachgewiesenen Antikörper erklärlich. Welcher Antikörper, ob der giftneutralisierende oder das Bakteriotropin den Heilfaktor ausmacht, ist nicht entschieden.

#### Literatur.

Jochmann, Deutsche med. Wochenschr., 1906.

Ruppel, Deutsche med. Wochenschr., 1906.

Flexner, Centralbl. f. Bakt., Bd. 43; The Journ. of exp. Med., 1907.

- Ghon, Ref. am XIV. intern. hyg. Kongreß.  
Kolle und Wassermann, Deutsche med. Wochenschr., 1907.  
Kolle, Ref. am XIV. intern. Kongr. für Hyg.  
Wassermann, Ref. am XIV. intern. Kongr. für Hyg.  
Flexner und Yobling, Journ. of exp. Med., 1908.  
Neufeld, Mediz. Klin., 1908, No. 30.  
Krumbein und Schattiloff, Deutsche med. Wochenschr., 1908.  
Krumbein und Diehl, Arbeiten aus dem Inst. z. Erf. d. Infektionskr.,  
Bern 1908. (G. Fischer.)  
Kraus und Doerr, Wiener klin. Wochenschr., 1908.  
Kraus und Baecher, Offiz. Prot. der Ges. der Aerzte in Wien, 1908,  
No. 49.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

**Weitere Beiträge zur Differenzierung des Cholera-vibrio  
von anderen Vibrionen mittels der Hämotoxine.**

Von Prof. R. Kraus und Prof. Y. Fukuhara (Osaka).

(Eingegangen bei der Redaktion am 9. Juni 1909.)

Auf Grund der früheren Untersuchungen an 70 Cholera-  
stämmen konnten wir (Kraus und Pribram, Prantschoff,  
Russ) die Behauptung aufstellen, daß biologisch sicher  
bestimmte Cholera-vibrionen zum Unterschiede  
von anderen Vibrionen kein Hämtoxin zu produ-  
zieren imstande sind und daß sie sich dadurch  
von anderen Vibrionen und den biologisch iden-  
tischen El Tor-Vibrionen sicher unterscheiden  
ließen.

Trotzdem diese Versuche, an zahlreichen Cholera-vibrionen  
ausgeführt, einwandfreies Beweismaterial geliefert haben und  
an der von uns aufgestellten Behauptung nicht zu zweifeln  
ist, findet der von uns vertretene Standpunkt, namentlich in  
Deutschland, keine allgemeine Anerkennung. Auf der I. Tagung  
der freien Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin haben

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. III.

3

Pfeiffer, Gotschlich, Gaffky der Hämotoxinbildung keine besondere Bedeutung zugesprochen und haben sich gegen unsere Forderung, die Blutplattenmethode als Ergänzung der biologischen Methode heranzuziehen, ablehnend verhalten.

Neuere Arbeiten von Bruck, Neufeld und Haendel, Besche und Kon versuchen mittels der Bordet-Gengou-schen Komplementablenkungsmethode die Identität der hämotoxischen El Tor-Vibrionen und des Cholera vibrio zu beweisen. Da diese Methode, wie aus den Arbeiten ersichtlich ist, zur Identifizierung des Cholera vibrios viel weniger leistet als die anerkannten biologischen Methoden, vermag auch sie die strittige Frage nicht entscheiden.

Die von E. Gotschlich vertretene Meinung, daß der Hämotoxinbildung nur eine untergeordnete Bedeutung zuzuschreiben wäre, da diese Eigenschaft zu inkonstant sei, ist nicht richtig. Die Hämotoxin bildenden Vibrionen, wie eigene Versuche uns überzeugt hatten, ändern ihre Eigenschaft trotz jahrelanger Züchtung auf künstlichem Nährboden nicht. Wir müssen die Bildung der Hämotoxine als eine ebenso konstante Eigenschaft dieser Vibrionen ansehen, wie die Bildung anderer Toxine bei anderen Bakterien, und dieselbe als eine prinzipielle, diese Vibrionen charakterisierende hinstellen. Im Gegensatz zu diesen Hämotoxinbildnern konnten wir bei zahlreichen Cholera vibrien bei wiederholter Untersuchung, trotz wiederholter Passage, keine Hämotoxine feststellen.

Neue Versuche in dieser Richtung sind geeignet, unseren Standpunkt noch mehr zu stützen. Namentlich möchten wir besonderes Gewicht auf diesbezügliche Untersuchungen legen, die sich auf Cholera vibrien, gezüchtet aus Cholerafällen in Arabien, beziehen. (Diese Stämme wurden uns durch Vermittelung des Herrn Dr. Kaller, Oesterr. Sanitätsdel. in Konstantinopel, von Herrn Dr. Delpino überlassen.) Herr Dr. Delpino hat in der vorjährigen Choleraepidemie in Arabien, aus an Cholera erkrankten Mekkapilgern

Vibrionen gezüchtet, die sich wie echte Cholera-vibrionen verhalten, d. h. biologisch identisch sich erweisen und an der Hammelblutplatte keine Hämolyse hervorrufen. (S. Tab. I.)

Tabelle I.  
Cholera-vibrionen aus Arabien 1908 (Delpino).  
9 Stämme.

Stamm	Agglutination	Hammelblutagarplatten
No. 2	1:2000	negativ
„ 3	1:800	„
„ 6	1:2000	„
„ 7	1:2000	„
„ 10	1:2000	„
„ 15	1:2000	„
„ 16	1:2000	„
„ 17	1:2000	„
„ 18	1:2000	„

Die El Tor-Vibrionen stammen ebenfalls von Mekkapilgern in Arabien, die an Kolitis und Dysenterie gestorben sind (1905). In diesem Jahre und auch die vorherigen Jahre war in Arabien keine Choleraepidemie. Plötzlich tritt im Jahre 1908 Cholera epidemisch unter den Mekkapilgern auf, und die Vibrionen, die jetzt gezüchtet werden, sind echte Cholera-vibrionen. Sie sind zwar mit den El Tor-Vibrionen kulturell und biologisch identisch, wirken aber nicht hämolytisch.

Ganz gleich verhalten sich auch Cholera-vibrionen, welche aus der Choleraepidemie 1908 in Rußland (Petersburg, Zarizyn, Astrachan) stammen und uns von Herrn Prof. Zabolotny freundlichst überlassen wurden. (Diese wurden zum größten Teil aus Dejekten gezüchtet, einzelne aus dem Newawasser, Trinkwasser in Petersburg.) Alle Vibrionen sind kulturell und biologisch als Cholera-vibrionen bestimmt worden und vermögen in der Hammel- und Ziegenblutagarplatte nicht hämolytisch zu wirken<sup>1)</sup>.

1) Von 2 Stämmen, welche in der Blutplatte hämolysierten, erwies sich der eine (aus Wasser in Astrachan) als ein Vibrio, der vom Cholera-

Tabelle II.  
Cholera-vibrionen aus Rußland 1908.  
38 Stämme.

Stamm	Agglutination	Hammelblutagarplatten
Petersburg Dejekte	1:2000	negativ
„ Grube	1:2000	„
„ Nawa	1:2000	„
„ filtr. Wasser	1:2000	„
„ a, c, e, e, 33, 100	1:2000	„
Zarizyn 1—17	1:2000	„
Petersburg 3, 6, 10, 17, 18, 42, 72	1:200	„
Stoer. 10, Kar. 10		
Haut. Jub 13		
Astrachan 94		

Daß man nach den vorgebrachten Tatsachen die El Tor-Vibrionen nicht als Cholera-vibrionen ansehen könne, wird ohne weiteres zugestanden werden müssen. Und selbst Pfeiffer hat sich durch eigene Versuche davon überzeugt, daß der von uns vertretene Standpunkt nicht die Ablehnung verdient, die ihm von Gotschlich, Gaffky, Kolle und Pfeiffer widerfahren ist.

Zunächst ist es die nach einigen Tierpassagen erreichte hohe Virulenz der El Tor-Vibrionen (bis  $\frac{1}{500}$  Oese), welche bei typischen Cholera-kulturen niemals zu konstatieren ist, welche Pfeiffer besonders hervorhebt. Dazu möchten wir hinzufügen, daß die Virulenz dieser Vibrionen ohne Tierpassage monate-, ja jahrelang auf einer gewissen Höhe,  $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{40}$  Oese, sich halten, was beim Cholera-vibrio ebenfalls nicht bekannt ist. Auch verläuft die Infektion, wie Pfeiffer betont, mit den El Tor-Vibrionen viel rascher als mit Cholera-vibrionen. Nachdem sich Pfeiffer auch von den hämotoxischen Eigenschaften der

serum nicht agglutiniert wird, der andere Stamm aus einer Leiche war überhaupt kein Vibrio. (2 andere Stämme haben nicht gelöst; davon war ein Stamm kein Vibrio, und Stamm Petersburg 54 war ein Vibrio, der mit Cholera-serum nicht agglutiniert.)

El Tor-Vibrionen überzeugt hatte, meint er, „daß man sich schwer dazu entschließen wird, sie ohne weiteres mit den typischen *Cholera-vibrionen* völlig zu identifizieren; dazu sind die Differenzen zu ausgeprägt“.

### Zusammenfassung.

Unsere Auffassung geht also dahin, daß die biologischen Reaktionen trotz ihrer außerordentlichen Feinheit und Wichtigkeit nicht absolut ausreichend sind. Es scheint uns auf Grund der von uns mitgeteilten Tatsachen nicht unberechtigt zu sein, die Blutplattenmethode (**Hammel-oder Ziegenblutagar**)<sup>1)</sup>, mittels welcher die hämotoxischen Eigenschaften leicht nachweisbar sind, als Ergänzung der biologischen Reaktionen heranzuziehen. Wenn auch für Vibrionen, die bei epidemisch aufgetretener Cholera gezüchtet werden, die biologische Methode, namentlich die Agglutination, in der Praxis ausgezeichnete Dienste leistet, erscheint es doch angezeigt, Vibrionen aus sporadischen Fällen gewonnen, auch auf ihre hämolytische Fähigkeit zu untersuchen. Die vorhandene Hämolyse an der Blutplatte spricht mit Sicherheit dafür, daß Vibrionen, selbst bei völliger biologischer Identität mit dem *Cholera-vibrio* nicht als *Cholera-vibrionen* anzusehen sind.

---

1) Trotzdem wir ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht haben, daß **Kaninchenblut** nicht verwendet werden darf, wollen einzelne Autoren mittels der **Kaninchenblutagarplatte** diese Frage entscheiden.



*Nachdruck verboten.*

[Aus dem staatlichen serotherapeutischen Institute (Hofrat Prof. Paltauf) und der I. chirurgischen Universitätsklinik (Hofrat Prof. A. Freiherr v. Eiselsberg) in Wien.]

### **Ueber die Wirkung von Toxinen und die Bildung von Antikörpern bei parabiologischen Tieren<sup>1)</sup>.**

Von

Privatdozent Dr. **E. Ranzi**,  
Assistent der Klinik.

und Dr. **H. Ehrlich**,  
Operationszögling der Klinik.

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. Juni 1909.)

Die vor 1½ Jahren publizierten Versuche Sauerbruchs und Heydes haben gezeigt, daß es gelingt, Tiere in eine dauernde Verbindung (Parabiose) zu bringen. Diese Experimente sind seither von einer Reihe von Autoren nachgeprüft und erweitert worden. Außer bei Kaninchen, mit welchen Sauerbruch und Heyde experimentierten, gelang die Parabiose bei Ratten (Morpurgo), Hunden (Forschbach), und Mäusen (Goldmann).

Die bisher an parabiologischen Tieren angestellten Versuche haben folgendes ergeben: zunächst konnten Sauerbruch und Heyde nachweisen, daß lösliche Stoffe von einem Tier auf das andere übergehen. Jodkali und Natrium salicylicum, das dem einen Tier injiziert wurde, konnte nach ¾ bzw. 1—2 Stunden im Harn des anderen Tieres nachgewiesen werden. Zum Beweis, daß auch lösliche Gifte übergehen, führen Sauerbruch und Heyde einen Versuch mit Strychnin an. Nach Injektion von 0,01 Strychnin konnte neben den heftigen Erscheinungen, die beim injizierten Tier auftraten und in 2 Minuten zum Exitus führten, auch beim anderen Tier Krampfanfälle ausgelöst werden. Daß auch Gifte, welche im Körper des einen Tieres entstehen, auf das Nachbartier übergehen, glauben Sauerbruch und Heyde aus der konstanten Temperaturerhöhung, welche bei dem einen der para-

1) Vortrag, gehalten auf der Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie in Wien, 4. Juni 1909.

biotischen Tiere auftrat, wenn bei dem anderen durch Abbinden des Darmes ein experimenteller Ileus erzeugt worden war, zu erschließen. Endlich haben die genannten Autoren gezeigt, daß nach Infektion des einen Tieres mit Milzbrand die Bakterien im Herzblut des anderen gefunden werden können.

Eine weitere Reihe von Versuchen beschäftigte sich mit der Frage, ob nach Exstirpation von lebenswichtigen Organen des einen Tieres die des anderen vikariierend eintreten können. Forschbachs Versuche über Pankreasexstirpation, Sauerbruchs und Heydes, sowie Jehns Befunde bei Exstirpation beider Nieren des einen Tieres, scheinen diese Frage zu bejahen.

Aus diesen vorerwähnten Versuchen scheint hervorzugehen, daß sich die parabiologischen Tiere bis zu einem gewissen Grad wie ein Organismus verhalten oder daß wenigstens enge Wechselbeziehungen zwischen den vereinigten Tieren vorhanden sind. Um diese Frage näher zu prüfen, haben wir auf Veranlassung von Herrn Prof. Kraus es unternommen, das Verhalten der parabiologischen Tiere gegenüber Infektion, Intoxikation und bei der Bildung von Antikörpern zu untersuchen.

Die Versuche wurden an Kaninchen, Ratten und Meerschweinchen angestellt. Wir können Morpurgo nach unseren Erfahrungen vollkommen beistimmen, wenn er die Ratten als besonders geeignet für Parabioseversuche empfiehlt. Von 16 Rattenpaaren gelang es 15mal, die Tiere durch längere Zeit in dauernder Parabiose zu erhalten; es wurden auch die größte Anzahl der Versuche an diesen Tieren vorgenommen. Von 11 parabiologischen Kaninchen konnten 6 zu den Versuchen verwendet werden; am schwierigsten gelang die Vereinigung beim Meerschweinchen. Unter 5 diesbezüglichen Versuchen blieben bloß 2 Paare lang genug am Leben, um an ihnen Versuche machen zu können. Bei allen Versuchen wurde die Verbindung beider Peritonealhöhlen (Cölostomie) ausgeführt, da dieselbe, wie Forschbach hervorhebt, eine sicherere Gewähr für die Heilung als die einfache Naht der Muskulatur ergibt. Von Wichtigkeit erscheint es uns, die Naht der Haut intrakutan nach Halsted anzulegen, wie diese von Clair-

mont in bisher noch nicht veröffentlichten Versuchen verwendet wurde, da hierdurch die Infektion der Hautnaht leichter vermieden wird. Von einer Fixation der Tiere nach der Operation durch Gipsverband haben wir abgesehen. Die Kaninchen wurden mit Heftpflasterstreifen, die um den Körper und um die korrespondierenden Füße gelegt wurden, gegeneinander fixiert. Bei Ratten und Meerschweinchen wurden die nebeneinanderliegenden Vorder- und Hinterfüße und die Haut des Nackens durch je eine Naht vereinigt.

Daß die ursprünglich von Sauerbruch und Heyde aufgestellten Bedingungen für das Zustandekommen der Parabiose: jugendliches Alter, Gleichgeschlechtlichkeit, Tiere vom selben Wurf, nicht unbedingt notwendig sind, wurde von Minkowski auf Grund der Experimente Forsbachs hervorgehoben. Auch Morpurgos Rattenversuche zeigen, daß die parabiologische Vereinigung sowohl bei gleichgeschlechtlichen als auch bei gemischtgeschlechtlichen Tieren gelingt. Zu unseren Versuchen wurden fast ausschließlich junge Tiere, ohne Rücksicht auf das Geschlecht verwendet. Während wir zu den Versuchen an Kaninchen und Meerschweinchen Tiere ein und desselben Wurfes nahmen, verwendeten wir zur Parabiose bei Ratten Tiere verschiedener Herkunft. Wie früher erwähnt, konnten wir hierbei in 15 unter 16 Versuchen dauernde Vereinigung erzielen, so daß wir, wenigstens was die Ratten anlangt, Sauerbruch und Heyde nicht beistimmen können, wenn sie in ihrer letzten Arbeit die Berücksichtigung der genannten Bedingungen als prinzipiell wichtig für die dauernde Vereinigung betrachten.

Zunächst können wir die Befunde Sauerbruchs und Heydes, daß lösliche Stoffe und gewisse Infektionserreger von einem Tier aufs andere übergehen, bestätigen. Wir spritzten zu diesem Zweck 5 Tage nach der parabiologischen Vereinigung bei zwei Ratten- und einem Kaninchenpaar je einem Tier Pferdeserum subkutan ein. Am Tage nach der Injektion und an den folgenden Tagen konnten wir die Anwesenheit von Pferdeserum sowohl im Blute des injizierten als auch in dem des nicht injizierten Tieres nachweisen. Wir bedienten uns hierzu eines Pferdeserum präzipitierenden Serums in trockener Form nach v. Eisler.

Kaninchenpaar 1. 24. April parabiotische Vereinigung. 29. April linkes Tier erhält 5,0 Pferdeserum („Mars“) subkutan. 30. April und 2. Mai Blutentnahme.

Präzipitationsversuch.

		1 : 20	1 : 50	1 : 100
Sera vom 30. April	Rechtes Tier	+	+	+
	Linkes Tier	+	+	+
Sera vom 2. Mai	Rechtes Tier	+	+	+
	Linkes Tier	+	+	+

Rattenpaar 1. 24. April parabiotische Vereinigung. 29. April linkes Tier erhält 5,0 Pferdeserum („Mars“) subkutan. 30. April und 2. Mai Blutentnahme.

Präzipitationsversuch.

		1 : 40	1 : 80	1 : 160
Sera vom 30. April	Rechtes Tier	+	+	+
	Linkes Tier	+	+	+
Sera vom 2. Mai	Rechtes Tier	+	+	+
	Linkes Tier	+	+	+

Rattenpaar 3. 26. April parabiotische Vereinigung. 2. Mai linkes Tier erhält 2,0 Pferdeserum („Laura“) subkutan. 4. Mai Blutentnahme.

Präzipitationsversuch mit Sera vom 4. Mai.

	1 : 10	1 : 40	1 : 80	1 : 200
Linkes Tier	+	+	+	+
Rechtes Tier	+		+	+

Zum Nachweis des Ueberganges lebender Infektionserreger infizierten wir Rattenpaare mit Trypanosomen und mit Lyssavirus (Fermi).

Rattenpaar 7. 4. Mai parabiotische Vereinigung. 8. Mai linkes Tier mit Nagana subkutan injiziert. 11. Mai Blutuntersuchung aus der Schwanzwurzel beider Ratten ergibt zahlreiche Trypanosomen. 13. Mai beide Tiere tot.

Zu wesentlich anderen Resultaten führten die Versuche mit Lyssa, auf die noch später näher eingegangen wird.

Rattenpaar 3. 26. April parabiotische Vereinigung. 5. Mai linkes Tier mit Aufschwemmung eines Lyssagehirns (Kaninchen) subkutan injiziert. 10. Mai linkes Tier tot, rechtes Tier stirbt beim Abtrennen (Sektion:

Peritonitis). Die Gehirne beider Ratten werden auf Kaninchen subdural übertragen.

Kaninchen 362 (geimpft mit Gehirn von der linken Ratte). 16. Mai Erscheinungen von Lyssa. 17. Mai schwere Lähmungen. 19. Mai Exitus.

Kaninchen 122. (Geimpft mit Gehirn von der rechten Ratte) bleibt dauernd gesund.

Rattenpaar 13. 8. Mai parabiotische Vereinigung. 14. Mai rechtes Tier mit einer Aufschwemmung eines Lyssagehirns (Kaninchen) subkutan injiziert. 19. Mai rechtes Tier leichte Erscheinungen, linkes Tier gesund. 20. Mai rechtes Tier Lähmungen, Exitus, linkes Tier abgetrennt. 21. Mai linkes Tier tot. Das Gehirn dieses Tieres auf ein Kaninchen subdural übertragen. Kaninchen bleibt dauernd gesund.

Kontrolle: Ratte. 5. Mai mit Gehirnemulsion von Lyssakaninchen subkutan infiziert, 11. Mai unter typischen Erscheinungen Exitus.

Ob und inwieweit Toxine von einem Tier auf das andere übergehen, wurde durch die folgenden Versuche ermittelt.

#### 1. Schlangengift.

Rattenpaar 1. 24. April parabiotische Vereinigung. 6. Mai linkes Tier 0,1 mg Schlangengift subkutan. Nach 1½ Stunden Tod. Rechtes Tier nach 5 Stunden krank, stirbt am 7. Mai (14 Stunden p. inj.).

Kontrolle: 6. Mai Ratte 0,1 mg Schlangengift subkutan, nach 2 Stunden tot.

#### 2. El Tortoxin.

Kaninchenpaar 4. 19. März parabiotische Vereinigung. 8. April linkes Tier erhält 4,0 El Tor-Toxin intravenös. Nach 3 Minuten zeigt dieses Tier schwere Erscheinungen, erhält nochmals 5,0 ccm Toxin intravenös, nach 3 Minuten linkes Tier tot, rechtes Tier geht nach 3½ Stunden zugrunde.

Kontrolle: Kaninchen. 8. April 2,0 El Tor-Toxin intravenös, nach 18 Minuten Exitus.

#### 3. Tetanustoxin.

Meerschweinchenpaar 2. 8. Mai parabiotische Vereinigung. 18. Mai rechtes Tier 0,00004 Tetanustoxin subkutan ins rechte Hinterbein. 19. Mai lokaler Tetanus im rechten Hinterbein, linkes Tier gesund. 20. Mai rechtes Tier Tetanus, linkes Tier zeigt keine tetanischen Erscheinungen. 21. Mai beide Tiere tot.

Kontrolle: Meerschweinchen 18. Mai 0,00004 Tetanustoxin subkutan ins linke Hinterbein, 19. Mai Steifigkeit im linken Hinterbein. 21. Mai Exitus.

Rattenpaar 14. 15. Mai parabiotische Vereinigung, 20. Mai rechtes Tier 0,00006 Tetanustoxin ins rechte Hinterbein subkutan. 21. Mai rechtes Tier lokaler Tetanus im rechten Hinterbein, linkes Tier gesund.

22. Mai. Die Tiere werden getrennt. 29. Mai rechtes Tier tot. 27. Mai linkes Tier 0,00006 Tetanustoxin subkutan ins linke Hinterbein. 28. Mai lokaler Tetanus.

Rattenpaar 15. 15. Mai parabiologische Vereinigung. 20. Mai rechtes Tier 0,00006 Tetanustoxin subkutan ins rechte Hinterbein. 21. Mai rechtes Tier lokaler Tetanus im rechten Hinterbein, linkes Tier gesund. 24. Mai. Die Tiere werden getrennt. 31. Mai rechtes Tier tot. 27. Mai linkes Tier 0,00006 Tetanustoxin subkutan ins linke Hinterbein. 28. Mai lokaler Tetanus.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß rasch tötende Toxine (Schlangengift, El Tortoxin) nicht auf das andere parabiologische Tier in einer solchen Menge übergehen, welche geeignet ist, Krankheitserscheinungen bzw. den Tod des zweiten Tieres hervorzurufen. Der Tod des zweiten Tieres nach  $3\frac{1}{2}$  bzw. 14 Stunden nach dem Exitus des ersten ist nicht mehr auf die Intoxikation zu beziehen, da ein gleiches zeitliches Verhalten bei spontanem Eingehen des einen Tieres sowohl von uns als auch von anderen Autoren beobachtet worden ist.

Anders jedoch liegen die Verhältnisse bei der Intoxikation mit Tetanustoxin. Kontrollen haben gezeigt, daß eine 5-fach tödliche Mäusedosis von Tetanustoxin bei einer Ratte nach 36 Stunden lokalen Tetanus, nach 4 Tagen den Exitus hervorruft. Nach den obenerwähnten Versuchen, nach welchen artfremdes Serum schon nach 24 Stunden im nicht injizierten Tier in derselben Konzentration wie im injizierten nachweisbar war, wäre auch für das Tetanustoxin die Möglichkeit des Ueberganges von einem Tier aufs andere vorhanden. Daß das andere Tier dauernd von tetanischen Symptomen frei bleibt, muß auf die Wanderung des Tetanustoxins im Nervensystem des injizierten Tieres und auf den Mangel von nervösen Verbindungen an der Anastomosenstelle zurückgeführt werden. Ob sich solche bei sehr lange bestehender Parabiose nicht doch endlich ausbilden, muß dahingestellt bleiben.

Ein ähnliches Verhalten müssen wir zur Erklärung der Lyssaversuche annehmen, auch hier kann infolge Mangels nervöser Verbindungen beider Tiere das Virus,

das längs der Nervenbahn wandert, vom injizierten auf das Nachbartier nicht übergehen.

Die passive Uebertragung von Antikörpern von einem Tier auf das andere konnte durch folgende Versuche gezeigt werden.

#### 1. Agglutinierendes Serum.

Rattenpaar 3. 26. April parabiologische Vereinigung. 2. Mai linkes Tier erhält 2,0 Typhus-Immuns Serum („Laura“) subkutan. 3. Mai Blutentnahme aus der Schwanzspitze beider Tiere.

Agglutinationsversuch (mikroskopisch) mit Sera vom 3. Mai.

	1:5	1:10	1:50
Linkes Tier	+	+	+
Rechtes Tier	+	+	+

#### 4. Mai Blutentnahme aus der V. jugularis beider Tiere.

Agglutinationsversuch (mikroskopisch) mit Sera vom 4. Mai.

	1:20	1:100	1:200
Linkes Tier	+	+	+
Rechtes Tier	+	+	+

Kontrollversuche mit normalem Rattenserum zeigten, daß dieses in den entsprechenden Verdünnungen Typhusbacillen nicht agglutiniert.

#### 2. Schlangengiftserum.

Rattenpaar 6. 1. Mai parabiologische Vereinigung. 7. Mai linkes Tier erhält 3,0 Schlangengiftserum subkutan. 8. Mai rechtes Tier erhält 0,1 mg Schlangengift subkutan, die Tiere bleiben dauernd gesund.

Kontrollen: Ratte (rot) 7. Mai 3,0 Schlangengiftserum subkutan, 8. Mai 0,1 mg Schlangengift subkutan. Tier bleibt dauernd gesund.

Ratte (blau) 8. Mai 0,1 mg Schlangengift subkutan; nach 2<sup>b</sup> Exitus.

#### 3. Diphtherieserum.

Meerschweinchenpaar 1. 10. Mai parabiologische Vereinigung. 15. Mai rechtes Tier erhält 2,0 Diphtherieserum („Landsknecht“) subkutan, 16. Mai linkes Tier erhält 0,1 Diphtherietoxin subkutan. Beide Tiere bleiben am Leben.

Meerschweinchenpaar 2. 8. Mai parabiologische Vereinigung. 15. Mai rechtes Tier erhält 2,0 Diphtherieserum („Landsknecht“) subkutan, 16. Mai linkes Tier erhält 0,1 Diphtherietoxin subkutan, beide Tiere bleiben am Leben.

Kontrolle: Meerschweinchen 217. 16. Mai 0,1 Diphtherietoxin subkutan. 17. Mai Exitus. Sektion: Seröse Flüssigkeit in Pleura und Peritoneum, Hyperämie der Nebennieren.

#### 4. Tetanuserum.

Rattenpaar 10. 12. Mai parabiotische Vereinigung. 16. Mai rechtes Tier erhält 2,0 Tetanuserum („Drusus“) subkutan. 17. Mai linkes Tier erhält 0,0001 Tetanustoxin ins linke Hinterbein. Die Tiere zeigen keine Tetanussymptome. 21. Mai beide Tiere tot.

Kontrolle: Ratte 11. Mai 0,0001 Tetanustoxin ins linke Hinterbein subkutan, 13. Mai Tetanus im linken Hinterbein, 15. Mai Exitus.

Das Verhalten der Tierpaare gegenüber der aktiven Immunisierung zeigen die folgenden Versuche.

Rattenpaar 2. 24. April parabiotische Vereinigung. 29. April rechtes Tier erhält 2 Oesen abgetöteter Cholerakultur, linkes Tier 2 Oesen abgetöteter Typhuskultur subkutan. 12. Mai (nach 13 Tagen) Aderlaß aus der V. jug. beider Tiere.

Agglutinationsversuch (makroskopisch) mit Sera vom 12. Mai.

	Typhus				Cholera			
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:40	1:80	1:160	1:320
Rechtes Tier	—	—	—	—	—	—	—	—
Linkes Tier	+	+	—	—	—	—	—	—

23. Mai (nach 24 Tagen) beide Tiere entblutet.

Agglutinationsversuch (makroskopisch) mit Sera vom 23. Mai.

	Typhus				Cholera			
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:40	1:80	1:160	1:320
Rechtes Tier	+	+	+	—	—	—	—	—
Linkes Tier	+	+	+	—	—	—	—	—

Kaninchenpaar 3. 26. April parabiotische Vereinigung. 29. April rechtes Tier erhält 2 Oesen abgetöteter Cholerakultur, linkes Tier 2 Oesen abgetöteter Typhuskultur subkutan. 11. Mai (nach 12 Tagen) rechtes Tier tot, Blutentnahme aus dem Herzen, linkes Tier entblutet.

Agglutinationsversuch (mikroskopisch) mit Sera vom 11. Mai.

	Typhus				Cholera			
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:40	1:80	1:160	1:320
Rechtes Tier	—	—	—	—	+	+	—	—
Linkes Tier	+	+	+	—	—	—	—	—



Rattenpaar 5. 26. April parabiotische Vereinigung. 29. April rechtes Tier erhält 2 Oesen abgetöteter Cholerakultur subkutan. 12. Mai (nach 13 Tagen) Aderlaß aus der V. jug. beider Tiere.

Agglutinationsversuch (makroskopisch) mit Sera vom 12. Mai.

	1:40	1:80	1:160	1:320
Rechtes Tier	+	+	—	—
Linkes Tier	—	—	—	—

23. Mai (nach 24 Tagen). Beide Tiere entblutet. Die mit den Seren angestellten Agglutinationsversuche fielen vollkommen negativ aus.

Rattenpaar 4. 26. April parabiotische Vereinigung. 29. April linkes Tier erhält 2 Oesen abgetöteter Typhuskultur subkutan. 12. Mai (nach 13 Tagen) beide Tiere entblutet.

Agglutinationsversuch (makroskopisch) mit Sera vom 12. Mai.

	1:40	1:80	1:160	1:320
Linkes Tier	+	+	—	—
Rechtes Tier	—	—	—	—

Während es also gelingt, die dem einen Tiere injizierten Antikörper (heterologes Serum) auch im anderen nachzuweisen, ist wie die Versuche zeigten, bei subkutaner Injektion kleiner Mengen von Antigen die Bildung der Antikörper nur auf das mit Antigen behandelte Tier beschränkt. Das Fehlen der Typhusagglutinine im nicht injizierten Tier bei der Untersuchung nach 11 Tagen und das Auftreten derselben nach 24 Tagen beim Rattenpaar 2 ist wohl mit großer Wahrscheinlichkeit als passive Uebertragung zu deuten. Der Uebergang des gebildeten und im Serum kreisenden Antikörpers auf das zweite Tier erfolgt erst nach Ablauf einer gewissen Zeit. Beim Rattenpaar 5 war das Choleraagglutinin schon nach 24 Tagen geschwunden und daher im Serum beider Tiere nicht mehr nachweisbar.

Von Sauerbruch und Heyde wurde die Parabiose in eine gewisse Parallele zu den Doppelmißbildungen gestellt. Unseres Erachtens können hier nur solche Mißbildungen herangezogen werden, bei welchen eine weitgehende Kommunikation großer Blutgefäße nicht vorliegt. In anderer Hinsicht erscheint uns der Vergleich zwischen parabiotischen

Tieren und dem Verhältnis von Mutter und Fötus als sehr zutreffend, insbesondere deshalb, weil bei beiden die Bildung und Uebertragung von Antikörpern in gleicher Weise erfolgt. Die grundlegenden Versuche Ehrlichs mit Mäusen, welche mit Ricin und Abrin vorbehandelt waren, haben gezeigt, daß der Uebergang der Immunität von Mutter auf Fötus bloß passiv erfolgt, indem die nach überstandener Infektion im Blute der Mutter gebildeten Antikörper in den Kreislauf des Fötus gelangen. Die gleiche ausschließlich passive Uebertragung von Antikörpern findet sich, wie aus den obigen Versuchen hervorgeht, auch bei parabiotischen Tieren.

Was den Uebergang von Stoffen (Serum, Antikörper) von einem Tier auf das andere anlangt, so könnte derselbe auf dreierlei Wegen erfolgen: durch die Peritonealhöhle, durch die Blutbahn und auf dem Wege der Lymphbahnen. Der erstere Weg erscheint uns nach dem, was wir über die Bildung und Verbreitungsweise der Antikörper wissen, als nicht wahrscheinlich. Sauerbruch und Heyde nehmen direkte Anastomosen der Blutgefäße beider Tiere an der Vereinigungsstelle an. Sie berufen sich einerseits auf histologische Untersuchungen, in denen sie den Uebergang von Gefäßsprossen am Anastomosenring fanden, andererseits beobachteten sie beim Abtrennen eines toten parabiotischen Tieres von dem lebenden im Bereich des toten Tieres eine echte Blutung. Eine Unterstützung ihrer Ansicht sehen Sauerbruch und Heyde in den Injektionspräparaten Goldmanns, der die in das Herz des einen Tieres injizierte Pelikantinte in den Organen des anderen nachweisen konnte. Bei unseren Versuchen konnten wir niemals die oben erwähnte Blutung im Bereiche des abgestorbenen Tieres beobachten. Auch Injektionsversuche, welche mit wässriger Berlinerblaulösung von der Aorta des einen Tieres aus gemacht wurden, führten wenigstens bei Ratten zu anderen Resultaten. Die Gefäßinjektion hörte scharf am Anastomosenring auf. Es erscheint uns daher wahrscheinlicher, daß der Austausch der Stoffe zum größten Teil durch die Lymphbahnen erfolgt, welcher Weg von Goldmann bei der Maus durch intravitale Färbung nachgewiesen wurde. Mit dieser Annahme stimmt auch die Tatsache überein, daß intravenös injizierte Gifte (El Tortoxin) beim anderen Tier

innerhalb kurzer Zeit noch keine Krankheitserscheinungen hervorrufen. Auch der langsame Uebergang von Antikörpern von einem Tier aufs andere würde dafür sprechen.

Zum Schlusse möchten wir noch Versuche erwähnen, welche sich mit der Parabiose von Ratte und Maus beschäftigen. Es ist uns bisher nicht gelungen Ratte und Maus länger als 12 Tage parabiologisch am Leben zu erhalten. Jedenfalls werden diese Versuche fortgesetzt werden müssen.

### Zusammenfassung.

Nach 5-tägiger Vereinigung sind die dem einen der parabiotischen Tiere injizierten Stoffe (artfremdes Serum, Trypanosomen) auch im Serum des zweiten Tieres nachweisbar. Der Uebergang erfolgt langsam auf dem Wege der Blutbahn oder wahrscheinlicher auf dem Wege der Lymphbahnen. Toxine und lebendes Virus (Lyssavirus) mit spezifischer Affinität zum Nervensystem sind für das nicht injizierte Tier unwirksam. Dem einen Tier subkutan injiziertes Antigen (kleine Mengen) löst die Bildung der Antikörper nur im injizierten Tier aus, das zweite Tier wird erst nach längerer Zeit passiv immun<sup>1)</sup>.

### Literatur.

- 1) Sauerbruch, F. und Heyde, M., Ueber Parabiose künstlich vereinigter Warmblüter. Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 4.
- 2) — — Weitere Mitteilungen über die Parabiose bei Warmblütern mit Versuchen über Pleus und Urämie. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap., Bd. 6, 1909.
- 3) Morpurgo, B., Ueber Parabiose von Säugetieren verschiedenen Geschlechts. Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 47,

---

1) Die Differenz unserer Versuche und der Friedberger und Nassetts (diese Zeitschr., Bd. 2, Heft 5) bezüglich der Antikörperbildung dürfte wohl, wie dies Friedberger in der Diskussion zu unserem Vortrag hervorhob, einerseits auf die verschiedene Einverleibung des Antigens, andererseits auf die größere Menge des Antigens, welche bei der intravenösen Injektion zur Aufnahme gelangt, zurückzuführen sein. Außerdem erklären ihre hohen Agglutinationswerte im aktiv immunisierten Tiere die frühzeitigen höheren Werte im parabiotischen (nicht immunisierten).

- 4) **Forschbach, J.**, Parabiose und Pankreasdiabetes. Deutsche med. Wochenschr., 1908, p. 910.
- 5) — Zur Pathogenese des Pankreasdiabetes. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 60, 1909, Heft 3.
- 6) **Goldmann**, zit. nach Sauerbruch und Heyde.
- 7) **Jehn, W.**, Beiträge zur Parabiose. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther., Bd. 6, 1909.
- 8) **Minkowski**, Zur Kenntnis der Funktion des Pankreas beim Zuckerverbrauch. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol., 1908, Suppl., Festschrift f. Schmiedeberg, p. 395.
- 9) **v. Eisler**, Ueber die Konservierung präzipitierender Sera auf Papier. Wiener klin. Wochenschr., 1906, p. 494.
- 10) **Ehrlich, P.**, Ueber Immunität durch Vererbung und Säugung. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 12, 1892, p. 183.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der experimentellen Abteilung des Instituts für Hygiene  
und experimentelle Therapie zu Marburg.]

### **Beiträge zur antitoxischen Immunisierung auf intestinalem Wege.**

Von Prof. Dr. **Paul H. Römer** und Dr. **Th. Sames**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. Juni 1909.)

In früheren Arbeiten haben Römer und Much (4, 5) gezeigt, daß von neugeborenen Kälbern auf intestinalem Wege bedeutend mehr Tetanusantitoxin resorbiert wird, wenn es den säugenden Muttertieren subkutan entweder vor der Geburt oder unmittelbar nach derselben injiziert wird, als wenn es dem Kalbe direkt, in vitro mit der Muttermilch gemischt, verabreicht wird. Quantitativ ausgedrückt verhielt sich die Stärke der Resorption des direkt gereichten Antitoxins zu der des indirekt (auf dem Wege über das Muttertier) verabfolgten Antitoxins höchstens wie 1:10. In Wirklichkeit waren wahrscheinlich die Differenzen noch größer im Sinne einer noch schlechteren Resorption des direkt gereichten Antitoxins bzw. einer besseren Resorption des indirekt gereichten Antitoxins. Die damaligen Versuche knüpften an frühere Experimente Salges (10) an, der ähnliches beim Menschen

*Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. III.*

4

beobachtet, aber nicht ganz eindeutige Versuchsbedingungen gewählt hatte. Später hat dann Much (2) dieselbe Versuchsanordnung, die für die oben zitierten Kälbersversuche angewandt war, auf den Menschen übertragen und auch hier das gleiche festgestellt. Es gingen in den Muchschen Versuchen bedeutend größere Mengen Antitoxin auf den saugenden Neugeborenen über, wenn die Muttermilch indirekt antitoxisch gemacht wurde (indem die säugende Mutter bzw. Amme subkutan antitoxisches Serum injiziert erhalten hatte), als wenn direkt der Muttermilch antitoxisches Serum in entsprechenden Quantitäten zugefügt war. Sodann hat Römer (6, 8) in einem — allerdings noch ergänzungsbedürftigen — Versuch an einem Fohlen nachgewiesen, daß auch bei Verwendung eines homologen, d. h. an artgleiches Eiweiß geknüpften Antitoxins, große quantitative Unterschiede in der Resorption zwischen indirektem und direktem Antitoxin bestehen. Wir bemerken hier gleich im voraus, daß wir unter indirektem Antitoxin in dieser Arbeit immer solches Antitoxin verstehen wollen, das nach subkutaner Injektion von antitoxischem Serum beim säugenden Muttertiere bzw. bei der Amme in die Milch übergeht. Mit direktem Antitoxin bezeichnen wir dagegen das der Muttermilch außerhalb des Tierkörpers *in vitro* zugemischte antitoxische Serum.

In der nachfolgenden Arbeit haben wir vergleichende Untersuchungen über die quantitative Resorption von indirektem und direktem Antitoxin bei jungen Schafen angestellt, dabei im wesentlichen der Versuchsanordnung folgend, die Römer und Much in den oben zitierten Experimenten am Rinde schon gewählt haben. Die Uebertragung dieser Versuche auch auf das Schaf schien uns deshalb berechtigt und notwendig, weil es auf alle Fälle interessant war, zu erfahren, ob die merkwürdigen für Mensch, Rind und Pferd nachgewiesenen Differenzen in der Resorption von indirektem und direktem Antitoxin auch für andere Säugetiere zutreffend sind, also etwas Gesetzmäßiges darstellen. Sodann ist gegen die Beweiskraft der früher von Römer und Much mitgeteilten Versuche am Rinde ein gewisser Einwand deshalb möglich, weil, wie Römer (7, 9) später nachgewiesen hat, sich im Blute älterer Rinder recht häufig normalerweise schon Tetanusanti-

toxin findet. Bei den damaligen Untersuchungen aber haben Römer und Much mit dieser Möglichkeit noch nicht gerechnet, da es bis zu den Römerschen Mitteilungen als feststehend galt, daß sich im Blute normaler, d. h. noch nie künstlich mit Tetanusgift oder Tetanusvirus in Berührung gebrachter Tiere niemals Tetanusantitoxin findet. Es wäre also theoretisch wohl möglich, daß in den Versuchen am Rinde, bei denen ein so beträchtlicher intestinaler Antitoxinübergang festgestellt wurde, die Ursache für diesen beträchtlichen Uebergang nicht in der Tatsache des indirekten Charakters des gereichten Antitoxins beruhte, sondern in dem Vorhandensein „normalen“ Antitoxins im Blute und in der Milch der betreffenden säugenden Muttertiere. Es erscheint uns unwahrscheinlich, daß eine solche Interpretation richtig ist; denn es wäre immerhin ein merkwürdiger Zufall, wenn dann gerade in den Versuchen mit indirekter Antitoxinfütterung die betreffenden Muttertiere schon normalerweise Antitoxin gehabt hätten und keine der Mütter jener Kälber, welche direkt mit Antitoxin gefüttert wurden. Die Berechtigung einer solchen Interpretation aber wird man nicht ohne weiteres ablehnen dürfen.

Eine Wiederholung der Versuche am Rinde unter Berücksichtigung der durch die Römerschen Befunde von normalem Antitoxin im Rinderblute gewonnenen Einsicht war uns leider aus Mangel an entsprechendem Versuchsmaterial unmöglich und wir sahen uns genötigt, unsere Untersuchungen an Schafen anzustellen. Wir bemerken gleich im voraus, daß, wie auch die nachfolgenden Einzelprotokolle teilweise demonstrieren werden, wir bisher im Blute der von uns untersuchten normalen Schafe (im ganzen 29) niemals Tetanusantitoxin gefunden haben und daß somit die Berechtigung des den Römer-Muchschen Rinderversuchen eventuell zu machenden Einwandes hier wegfällt.

Bei Anstellung unserer Experimente ergab sich, daß sich die Möglichkeit einer Antitoxinresorption beim neugeborenen Schaf im wesentlichen auf die beiden ersten Lebenstage beschränkt und daß, wenn später überhaupt noch Antitoxin resorbiert wird, die unter den von uns gewählten Bedingungen resorbierten Antitoxinmengen sich dem Nachweis entziehen.

4\*

Wir teilen deshalb unsere Versuche in solche ein, bei denen die Antitoxinfütterung — sei es nun mit direktem oder indirektem Antitoxin — sofort nach der Geburt begann, und in diejenigen Experimente, wo mit Antitoxinfütterung erst 2—3 Tage nach der Geburt begonnen wurde.

Für die nachfolgenden Versuche wurde stets das gleiche Tetanusgift sowie Tetanusserum benutzt. Das Tetanusgift (Tet. G. M. vom 20. Mai 1908) ist das gleiche, das zu einer früheren Arbeit Römers (9) benutzt war. Die im Oktober 1908 ermittelten Giftwerte können in der genannten Arbeit nachgesehen werden. Die erneute Einstellung des direkten und indirekten Giftwertes ergab folgendes:

#### a) Direkter Giftwert.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Ergebnis
6314	15	0,00002	Mäßiger Tetanus, erholt sich
6313	15	0,00004	Starker Tetanus, erholt sich
6316	15	0,00006	† nach 6 Tagen
6321	15	0,00008	† nach 67 Stunden

Es betrug die tödliche Minimaldosis (d. h. die nach 4 Tagen tödliche Dosis) für eine Maus von 15 g 0,00007 ccm oder 1 ccm war die tödliche Dosis für ca. 200 000 g Maus (1 ccm = 200 000 + Ms., früher 400 000 + Ms.).

#### b) Indirekter Giftwert.

Als Tetanusserum für die Einstellung des Giftes ist ein in seinem Wert seit Jahren unverändertes 6-faches Tetanusserum No. 70 (1 ccm = 6 Tet. A. E.) verwandt;  $\frac{1}{6000}$  ccm des Serums repräsentieren  $\frac{1}{1000}$  AE.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Antitoxindosis	Ergebnis
6317	18	0,006 ccm	$\frac{1}{6000}$ ccm	Spur Tetanus
6315	13,5	0,0065 "	" "	Mäßiger Tetanus, erholt sich
6318	16	0,007 "	" "	Starker Tetanus, erholt sich
6319	13,5	0,0075 "	" "	† nach $7\frac{1}{2}$ Tagen
6324	12,0	0,0075 "	" "	† nach 8 Tagen
6323	12,0	0,008 "	" "	† nach 68 Stunden
6322	12,0	0,009 "	" "	† nach 36 Stunden

Es entsprach also die Dosis von 0,008 ccm Gift =  $\frac{1}{1000}$  Gifteinheit, d. h. der Dosis, die von  $\frac{1}{1000}$  AE unter den oben genannten Bedingungen zu L† im Mäuseversuch neutralisiert wird.

Bei den nachfolgenden Untersuchungen wurde nun vielfach auf kleinere Antitoxinmengen als  $\frac{1}{1000}$  AE geprüft, infolgedessen mußten auch kleinere Gift Dosen als 0,008 zur Auswertung benutzt werden. Da aber bekanntlich mit geringerem Giftgehalt der relative Antitoxinbedarf zur Neutralisierung größer wird, mußten für die kleineren Gift Dosen erst die Antitoxindosen des Testserums ermittelt werden, welche mit ihnen  $L_{\dagger}$  ergaben. Es wurden von dem benutzten Tetanusgift zu  $L_{\dagger}$  neutralisiert:

0,008	von $\frac{1}{1000}$	AE.	0,001	von $\frac{1}{4000}$	AE.
0,004	" $\frac{1}{2000}$	"	0,0007	" $\frac{1}{4500}$	"
0,003	" $\frac{1}{2500}$	"	0,0003	" $\frac{1}{10000}$	"
0,002	" $\frac{1}{5000}$	"			

Der indirekte Giftwert blieb während der ganzen Dauer der Versuche unverändert, während der direkte Giftwert eine weitere Abschwächung erfuhr, so daß wir die tödliche Minimaldosis von 0,00007 allmählich auf 0,00009 ccm erhöhten.

#### c) Einstellung des benutzten Tetanusserums (Tet.-Ballonserum).

Maus No.	Gewicht g	Gift Dosis	Serum-dosis	Ergebnis
6331	14	0,008 ccm	$\frac{1}{8500}$ ccm	0
6335	14	" "	$\frac{1}{4000}$ "	0
6333	15	" "	$\frac{1}{4500}$ "	Geringer Tetanus, erholt sich
6350	15	" "	$\frac{1}{5000}$ "	Sehr starker Tetanus, erholt sich
6349	14	" "	$\frac{1}{8000}$ "	† nach 70 Stunden
6348	16	" "	$\frac{1}{7500}$ "	† nach 44 Stunden

Die die Testgift Dosis von 0,008 zu  $L_{\dagger}$  neutralisierende Antitoxindosis lag also etwa bei  $\frac{1}{5500}$  ccm des Serums oder 1 ccm Tetanusballonserum enthielt 5,5 AE.

#### I. Indirekte Antitoxinfütterung, sofort nach der Geburt beginnend.

##### 1. Versuch.

Das gesunde Schaf No. 41, 3 Jahre alt, zum dritten Mal gravid, erhält am 3. März 1909 52 ccm Tetanusballonserum = 286 TetAE subkutan. Am 5. März 1909 erfolgt die Geburt von 2 gesunden Bocklämmern, No. 104 und 105, jedes von einem Gewicht von 3 kg. Sofort nach der Geburt wird den beiden Jungen eine Blutprobe abgenommen, ebenso dem Muttertier eine Milchprobe (Colostralmilch) und auf Antitoxin geprüft.



a) Prüfung des Serums von Schaf 104 und 105  
vom 5. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumdosis	Ergebnis
6436	15	0,00008 ccm	—	† nach 8½ Tagen
6434	14	„ „	0,3 Serum 104	† nach 9 Tagen
6439	16	„ „	0,3 „ 105	† nach 7½ Tagen

Das Blut der Jungen war also unmittelbar nach der Geburt antitoxinfrei; es war also intrauterin entsprechend früheren Erfahrungen (3) keine Spur Antitoxin übergegangen.

b) Untersuchung der Milch von Schaf 41 vom 5. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Milch-dosis	Ergebnis
6441	12	0,008 ccm	0,3 ccm	0
6440	12	„ „	0,1 „	0
6462	12	„ „	0,075 „	† nach 3½ Tagen
6463	12	„ „	0,05 „	† nach 43 Stunden

Es neutralisieren also ca. 0,08 ccm Milch  $\frac{1}{1000}$  GE; 1 ccm Milch also  $\frac{1}{80}$  GE; 1 ccm Milch enthielt  $\frac{1}{80}$  AE.

Eine erneute Milchprobe des Schafes 41, die nicht mehr kolostralen Charakter hatte, wurde am 9. März untersucht mit folgendem Ergebnis:

c) Prüfung der Milch von Schaf 41 vom 9. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Milch-dosis	Ergebnis
6473	15	0,003	0,3 ccm	0
6461	11	0,005	0,3 „	† nach 42 Stunden
6460	12	0,008	0,3 „	† nach 35 Stunden
6453	12	0,008	0,1 „	† nach 18 Stunden

0,3 ccm Milch neutralisierten also ca. 0,004 ccm Gift zu L†, entsprachen also  $\frac{1}{2000}$  AE; mithin enthielt 1 ccm Milch ca.  $\frac{1}{600}$  AE.

Die Jungen wurden dauernd in natürlicher Weise am Euter der Mutter genährt. Am 12. März 1909, also nach im ganzen 7-tägiger Säugung, wurde beiden eine Blutprobe entnommen und das abgeschiedene Serum auf Antitoxin geprüft.

d) Prüfung des Serums vom Schaf 104 und 105  
vom 12. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumdosis	Ergebnis
6472	15	0,0002	0,3 Serum 104	0
6471	14	0,002	0,3 „ 104	† nach 4 Tagen.
6370	15	0,0002	0,3 „ 105	0
6475	17	0,002	0,3 „ 105	0
6505	13,5	0,003	0,3 „ 105	Geringer Tetanus, erholt sich.
6478	14,0	0,004	0,3 „ 105	† nach 62 Stunden.

Es neutralisierten also 0,3 ccm Serum 104 0,002 ccm des Giftes zu ca. L<sub>+</sub>; 0,3 Serum entsprachen also  $\frac{1}{3000}$  AE; 1 ccm Serum 104 enthielt also ca.  $\frac{1}{900}$  AE.

Es neutralisierten 0,3 ccm Serum 105 ca. 0,0035 ccm Gift zu L<sub>+</sub>; 0,3 ccm Serum entsprachen also  $\frac{1}{2500}$  AE; 1 ccm Serum 105 enthielt also ca.  $\frac{1}{700}$  AE.

Wieviel von dem verfütterten Antitoxin ist nun von den jungen Schafen resorbiert worden? — Wir müssen zu dem Zweck feststellen:

- 1) die Menge des aufgenommenen Antitoxins,
- 2) die Gesamtmenge des Antitoxins im Blute der jungen neugeborenen Schafe.

Ad 1.) Die Colostralmilch enthielt pro 1 ccm  $\frac{1}{80}$  AE. Wenn wir zunächst einmal von der — ganz gewiß nicht richtigen — Annahme ausgehen, die Milch hätte bis zum 9. März unverändert den gleichen Antitoxingehalt behalten (tatsächlich ist der Antitoxingehalt der nicht colostralen Milch mindestens 5mal geringer) und weiter annehmen, was wohl der Wahrheit sehr nahe kommen dürfte, daß jeder der beiden Zwillinge pro Tag höchstens 150 ccm Muttermilch aufgenommen hat, so würde unter Zugrundelegung dieser Berechnung jedem der Jungen in den ersten 4 Tagen gereicht sein  $\frac{4 \times 150}{80}$  AE = 7,5 AE. Nehmen wir sodann weiter an, daß in den 3 folgenden Tagen (9. März bis 12. März) die Muttermilch dauernd den am 9. März ermittelten Antitoxingehalt von  $\frac{1}{600}$  AE pro 1 ccm beibehalten und jedes Schaf von dieser Milch täglich 200 ccm aufgenommen hätte, so wäre in diesen 3 Tagen jedem Schaf gereicht  $\frac{200 \times 3}{600}$  AE = 1 AE. Insgesamt wären also an jedes Schaf verfüttert worden  $7,5 + 1 = 8,5$  AE und zwar bezeichnet diese Menge die Höchstmenge, welche dem jungen Schafe gereicht sein kann. In Wirklichkeit haben die jungen Schafe sicherlich bedeutend weniger, vielleicht nur 2—3 AE erhalten.

Ad 2.) 1 ccm Serum von 104 enthielt  $\frac{1}{900}$  AE. Das Gewicht betrug am gleichen Tage 4000 g. Unter Zugrundelegung der Berechnung, daß die Serummenge eines Tieres in der Regel  $\frac{1}{20}$  des Körpergewichts entspricht, hätte also das

Schaf 104 insgesamt in seinem Blute  $\frac{200}{900} = \frac{1}{4,5}$  AE gehabt. — Eine entsprechende Berechnung für Schaf 105 mit nur 3000 g Gewicht am 12. März ergibt  $\frac{150}{700}$  AE =  $\frac{1}{4,6}$  AE.

Die Resorption ist also bei beiden Schafen eine ziemlich gleichmäßige und von den (nach obiger Berechnung) höchstens insgesamt verfütterten 8,5 AE wäre von jedem resorbiert  $\frac{1}{4,5}$  bzw.  $\frac{1}{4,6}$  AE =  $\frac{1}{88}$  bzw.  $\frac{1}{89}$  der verfütterten Antitoxinmenge. Das entspricht, wie wir noch einmal unter Verweisung der Erörterung ad 1 wiederholen wollen, der Mindestmenge des resorbierten Antitoxins. Wahrscheinlich ist das Verhältnis der resorbierten zu der verfütterten Antitoxinmenge ein noch größeres, da letztere in Wirklichkeit erheblich geringer war, als auf Grund unserer Berechnung angenommen werden muß.

Ad 2.) Eine zweite Berechnungsart, um festzustellen, wieviel Antitoxin von den jungen Schafen resorbiert ist, geht aus von einem sehr rationellen Vorschlage Hamburgers (1). Einem normalen jungen Schafe (No. 100) von gleichem Gewicht (3000 g) wie das der Schafe 104 und 105, dessen Blut tetanusantitoxinfrei war, injizierten wir subkutan 0,9 ccm Tet.-Ballonserum = 4,75 AE, also ca. die Hälfte dessen, was nach obiger Berechnung im Höchstfalle an die jungen Schafe 104 und 105 verfütterter war. Die Prüfung der dem Schaf 100 nach 40 Stunden abgenommenen Blutprobe bzw. Serumprobe hatte folgendes Ergebnis:

Maus No.	Gewicht g	Gift-dosis	Serumdosis	Ergebnis
6425	15,0	0,008	0,2 ccm Serum 100	0
6424	15,0	„	0,1 „ „ „	Spur Tetanus, erholt sich
5432	12,0	„	0,075 „ „ „	† nach 4 Tagen
6423	14,0	„	0,05 „ „ „	† nach 36 Stunden.

0,075 ccm des Serums 100 neutralisieren also 0,008 ccm Gift zu L†, enthalten also  $\frac{1}{1000}$  AE; 1 ccm des Serums 100 enthielt mithin  $\frac{1}{75}$  AE nach subkutaner Injektion von 4,75 AE; nach Injektion von 8,5 AE (der an die Schafe 104 und 105 verfütterten doppelt so großen Antitoxinmenge) würden wir dann vermutlich auch die doppelte Antitoxinmenge, d. h. ca.  $\frac{1}{40}$  AE pro 1 ccm Blutserum gefunden haben. Bei den antitoxingefütterten Tieren 104 und 105 tritt  $\frac{1}{700}$  bzw.  $\frac{1}{900}$  AE pro ccm Blutserum auf. Nach dem Vergleich des

quantitativen Ergebnisses des Antitoxinfütterungsversuches an den Schafen 104 und 105 mit dem Antitoxininjektionsversuch an Schaf 100 wäre bei den erstgenannten beiden Schafen  $\frac{1}{17}$  bzw.  $\frac{1}{22}$  des verfütterten Antitoxins resorbiert worden.

Wir kommen also bei dieser zweiten, vielleicht noch genaueren Berechnung zu einer noch höheren resorbierten Antitoxinmenge bei den jungen Schafen 104 und 105. Nehmen wir das arithmetische Mittel aus der erstzitierten Berechnung ( $\frac{1}{38}$  bis  $\frac{1}{39}$ ) und der letztangeführten ( $\frac{1}{17}$  bis  $\frac{1}{22}$ ), so kommen wir zu  $\frac{1}{29}$ .

Es ist also von dem verfütterten Antitoxin von jedem der jungen Schafe mindestens  $\frac{1}{29}$  resorbiert worden. Wir betonen mindestens, weil in der Berechnung ad 1 wir nicht ohne Absicht die Bestimmung der verfütterten Antitoxinmenge höher angenommen haben, als der Wirklichkeit entspricht.

## 2. Versuch.

Ein gesundes Mutterschaf No. 51, ca. 4 Jahre alt, zum zweiten Mal gravid, erhält am 3. März 1909 52 ccm Tetanusballonserum = 286 AE subkutan. Zwischen dem Abend des 8. und dem Morgen des 9. März 09 erfolgt die Geburt eines gesunden Mutterlammes (No. 107) von 3 kg Gewicht. Das neugeborene Tier hatte jedenfalls, als seine Existenz bemerkt wurde, schon an der Mutter gesogen, da eine dieser abgenommene Milchprobe keinen colostralen Charakter mehr hatte. Am Morgen des 9. März wurde dem jungen Schaf 107 eine Blutprobe, dem Muttertier eine Milchprobe entnommen und beide auf Antitoxin geprüft.

### a) Prüfung des Serums von Schaf 107 vom 9. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serum-dosis	Ergebnis
6448	12	0,00008 ccm	—	† nach 7 Tagen (Kontrolltier)
6451	12	0,00008 „	0,3 ccm	0
6474	13,5	0,00009 „	0,3 „	0
6476	14,0	0,0004 „	0,3 „	0
6491	15,0	0,001 „	0,3 „	Mäßiger Tetanus, erholt sich
6511	11,0	0,002 „	0,3 „	† nach 4 Tagen

Es enthielt also das Serum des Schafes 107 am Morgen des 9. März 1909 ca.  $\frac{1}{900}$  AE. Wir lassen es dahingestellt, ob dieser Antitoxingehalt des Blutserums bereits auf erfolgte extrauterine Antitoxinübertragung durch die Milch zurückzuführen ist, oder auf einen intrauterinen Antitoxinübergang. Gegen letzteres Moment würde sprechen, daß Römer (3)

in zahlreichen früheren Versuchen bisher niemals intrauterinen Antitoxinübergang bei Schafen feststellen konnte, denen subkutan Tetanusantitoxin vor der Niederkunft injiziert war. Für einen intrauterinen Antitoxinübergang in diesem Fall würde sprechen, daß die Menge des Antitoxins im Blute des sicherlich nicht über 14 Stunden alten Schafes schon eine so beträchtliche war. Für die nachfolgende Berechnung der mit der Säugung resorbierten Antitoxinmenge sei jedenfalls diese 14 Stunden nach der Geburt bei Schaf 107 gefundene Antitoxinmenge als intrauterin übertragen angesehen. Da das Gewicht des Schafes 107 3000 g betrug und 1 ccm  $\frac{1}{900}$  AE enthielt, so enthielt das Gesamtblut ca.  $\frac{150}{900}$  AE =  $\frac{1}{6}$  AE.

b) Prüfung der Milch von Schaf 51 vom 9. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Milch-dosis	Ergebnis
6457	12	0,008 ccm	0,2 ccm	0
6452	13	0,008 „	0,1 „	† nach 36 Stunden

Es enthielt 1 ccm Milch somit ca.  $\frac{1}{150}$  AE pro Kubikzentimeter. Unter der Annahme, daß das junge Schaf bis zum 16. März, dem Tag einer weiteren Serumprüfung, stets eine Milch mit dem gleichen Antitoxingehalt aufgenommen hat, und zwar etwa 200 ccm pro Tag, hätte es während der 7-tägigen Säugung im ganzen aufgenommen  $\frac{7 \times 200}{150}$  AE = ca. 10 AE. Auch hier ist die verfütterte Antitoxinmenge jedenfalls höher angenommen als der Wirklichkeit entspricht.

Die dem Schaf 107 am 16. März 1909 abgenommene Serumprobe ergab folgendes bei der Prüfung:

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumdosis	Ergebnis
6477	14	0,002 ccm	0,3 ccm Serum 107	0
6499	13,5	0,003 „	0,3 „ „ 107	0
6479	13	0,004 „	0,3 „ „ 107	† nach 45 Stunden
6486	13	0,008 „	0,3 „ „ 107	† nach 28½ Stunden

Es enthielt also 1 ccm des Serums von Schaf 107 am 16. März 1909 ca.  $\frac{1}{700}$  AE. Das Gewicht betrug am 16. März 4000 g. Im Gesamtblut also fanden sich (vergl. Berechnung p. 56)  $\frac{200}{700}$  AE =  $\frac{2}{7}$  AE; resorbiert waren also, da wir  $\frac{1}{6}$  AE auf intrauterinen Antitoxinübergang bezogen haben,  $\frac{2}{7} - \frac{1}{6}$  =  $\frac{5}{42}$  AE = ca.  $\frac{1}{8}$  AE. Insgesamt verfüttert waren 10 AE;

es wäre also von diesem Schaf resorbiert mindestens  $\frac{1}{80}$  der verfütterten Antitoxinmenge. Die Differenz mit dem quantitativen Ergebnis des ersten Versuches dürfte nicht sehr erheblich sein, wenn wir berücksichtigen, daß wir sicherlich nicht mit Recht die gesamte 14 Stunden nach der Geburt gefundene Antitoxinmenge auf intrauterinen Antitoxinübergang bezogen haben.

### 3. Versuch.

Wir zitieren endlich noch als hierher passend einen schon früher von Römer (3) mitgeteilten Versuch. Ein gravides Schaf (No. 22) erhält am 31. Januar 1904 eine subkutane Injektion von 25 ccm eines 8-fachen Tetanusserums (= 200 AE), also eine Dosis, die etwa der in den oben genannten Versuchen angewandten entsprach. 24 Stunden später erfolgt die Geburt eines gesunden Jungen (Schaf 22a). Das Serum des Schafes 22a war unmittelbar nach der Geburt antitoxinfrei; Schaf 22a wurde von der Mutter gesäugt. Die Antitoxinmenge in der Muttermilch ist hier allerdings nicht ausdrücklich bestimmt worden. Das Serum des Mutterschafes 22 enthielt etwa  $\frac{1}{80}$  AE pro Kubikzentimeter. Da das Mutterschaf ungefähr dieselbe Dosis wie die Mutterschafe des ersten und zweiten Versuches erhalten hat, ist wohl an das junge Tier ungefähr die gleiche Antitoxinmenge wie im ersten Versuch verfüttert worden.

Nach 5-tägiger Säugung wurde am 6. Febr. 1904 das Serum des jungen Schafes auf Antitoxin geprüft. Es fand sich pro Kubikzentimeter  $\frac{1}{1000}$  AE. Es stimmt also dieses Ergebnis quantitativ ziemlich genau mit dem der ersten Versuche überein.

Insgesamt können wir somit aus dem Prüfungsergebnis der drei angeführten Versuche resümieren, daß von neugeborenen Schafen ziemlich beträchtliche Mengen Antitoxin resorbiert werden, wenn sie es unmittelbar nach der Geburt in der Form indirekten Antitoxins mit der Muttermilch erhalten. Die Immunisierung des Muttertieres erfolgte dabei mit einem heterologen (Pferde-) Antitoxin. Quantitativ ausgedrückt, resorbierten unter den ge-

nannten Bedingungen neugeborene Schafe bei 7-tägiger Säugung mit indirekt antitoxinhaltiger Muttermilch durchschnittlich  $\frac{1}{50}$  des verfütterten Antitoxins.

## II. Direkte Antitoxinfütterung sofort nach der Geburt beginnend.

### 1. Versuch.

Schaf 47, ein gesundes Schaf, 3 Jahre alt, zum dritten Mal gravid, wirft am 15. März 1902 2 gesunde Mutterlämmer, No. 109 und 110. Sofort nach der Geburt wird dem Muttertiere eine Milch- und Blutprobe abgenommen und auf Antitoxin geprüft. Jedes der Jungen erhält sofort nach der Geburt und von da ab täglich bis zum 21. März 1909 einschließlich 2 ccm 5-fach verdünntes Tetanusballonserum = 2,25 TetAE pro Tag, insgesamt also 15,75 AE.

#### a) Prüfung von Milch und Serum Schaf 47 vom 15. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Milch- bzw. Serumdosis	Ergebnis
6482	13	0,00009 ccm	—	mäßiger Tetanus, erholt sich (Kontrolltier)
6481	12	0,00009 „	0,3 ccm Milch	mäßiger Tetanus, erholt sich
6480	14	0,00009 „	0,3 „ Serum	mäßiger Tetanus, erholt sich

Es war also Blut und Milch des normalen Schafes 47 frei von Tetanusantitoxin.

#### b) Prüfung des Serums von Schaf 109 und Schaf 110 vom 22. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumdosis	Ergebnis
6513	11,5	0,00009 ccm	—	starker Tetanus, erholt sich (Kontrolltier)
6528	10	0,0002 „	—	† nach 36 Stunden (Kontrolltier)
6514	12	0,00009 „	0,3 ccm Serum 109	0
6524	10	0,0002 „	0,3 „ „ 109	0
6535	10	0,0004 „	0,3 „ „ 109	† nach 4 Tagen
6534	10	0,002 „	0,3 „ „ 109	† nach 20 Stunden
6512	12	0,00009 „	0,3 ccm Serum 110	0
6526	11	0,0002 „	0,3 „ „ 110	0
6533	10	0,0004 „	0,3 „ „ 110	0
6543	10,5	0,0006 „	0,3 „ „ 110	Spur Tetanus. erholt sich
6546	10	0,0008 „	0,3 „ „ 110	† nach $5\frac{1}{2}$ Tagen
6545	11	0,001 „	0,3 „ „ 110	† nach 60 Stunden
6532	10	0,002 „	0,3 „ „ 110	† nach 24 Stunden

Es enthielt also 1 ccm des Serums 109 =  $\frac{1}{2500}$  AE. Das Tier wog am 22. März 2500 g, sein Gesamtblut enthielt also  $\frac{125}{2500}$  AE = ca.  $\frac{1}{20}$  AE; 1 ccm Blutserum von Schaf 110 enthielt = ca.  $\frac{1}{1500}$ , sein Gewicht betrug 3000 g, sein Gesamtblut enthielt also  $\frac{150}{1500}$  AE =  $\frac{1}{10}$  AE.

Von den verfütterten 15,75 AE hätte also Schaf 109 resorbiert  $\frac{1}{300}$ , Schaf 110 etwa  $\frac{1}{157}$ .

Es war also die Resorption des direkt gereichten Antitoxins, verglichen mit den obigen sub I zitierten Versuchen mit indirekter Antitoxinfütterung, bedeutend geringer (4—5mal).

## 2. Versuch.

In den nächstfolgenden Versuchen haben wir absichtlich eine im Vergleich mit der indirekten Antitoxinfütterung sehr starke Ueberfütterung mit direktem Antitoxin vorgenommen.

Schaf 49, zum dritten Mal gravid, wirft am 12. Febr. 1909 ein gesundes Bocklamm von 3000 g Gewicht (No. 96). Sofort nach der Geburt des Jungen wird dem Muttertier eine Milch- und Blutprobe abgenommen und auf Antitoxin geprüft.

### a) Prüfung von Milch und Serum Schaf 49 vom 12. Febr. 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Milch- bzw. Serumdosis	Ergebnis
6330	16	0,00007 ccm	—	† nach 7 Tagen
6329	15	0,00007 „	0,3 ccm Milch	† nach 6½ Tagen
6328	13	0,00007 „	0,3 „ Serum	† nach 7 Tagen

Es war also Blut und Milch des Muttertieres frei von Tetanusantitoxin.

Das neugeborene Schaf 96 erhält sofort nach der Geburt und von da ab täglich bis zum 18. Febr. 1909 7,5 ccm Tetanusballonserum, also insgesamt ( $7,5 \times 5,5 \times 7$ ) 288,75 AE.

Am 20. Febr. wird Schaf 96 eine Blutprobe abgenommen und auf Antitoxin geprüft.

### b) Prüfung des Serums von Schaf 96 vom 20. Febr. 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumdosis	Ergebnis
6366	14,5	0,00007 ccm	—	† nach 7 Tagen
6363	17,0	0,00007 „	0,3 ccm	glatt
6376	14,0	0,003 „	0,3 „	glatt
6384	14,0	0,005 „	0,3 „	† nach 28 Stunden
6365	14,0	0,007 „	0,3 „	† nach 24 Stunden

Es enthielt also 1 ccm des Serums 96 ca.  $\frac{1}{660}$  AE.



Das Tier wog am 20. Febr. 4000 g. Sein Gesamtblut enthielt also  $\frac{200}{660}$  AE =  $\frac{1}{3,3}$  AE. Von den insgesamt verfütterten 288,75 AE ist also resorbiert insgesamt ungefähr  $\frac{1}{900}$ .

Zur Kontrolle der quantitativen Berechnung der Antitoxinresorption injizierten wir einem jungen antitoxinfreien Schaf-lamm (No. 99) vom gleichen Gewicht 26,5 ccm Tetanusballon-serum = 145 AE, also ungefähr die Hälfte der Dosis, die wir an Schaf 96 verfüttert hatten. Eine nach 48 Stunden abgenommene Blutprobe ergab bei der Prüfung folgendes:

Maus No.	Gewicht g	Gift-dosis	Serum-dosis	Ergebnis
6391	14,0	0,008 ccm	$\frac{1}{200}$ ccm	glatt
6426	14,5	0,008 „	$\frac{1}{280}$ „	glatt
6427	14,0	0,008 „	$\frac{1}{260}$ „	geringer Tetanus, erholt sich
6409	13,0	0,008 „	$\frac{1}{300}$ „	† nach 40 Stunden

Es enthielt also 1 ccm des Serums 99 etwa 0,28 AE. Da wir vermutlich nach Injektion der doppelten Dosis (d. h. der an Schaf 96 verfütterten Antitoxinmenge) ca. 0,5 AE pro Kubikzentimeter Serum bei Schaf 99 gefunden haben würden, wäre nach dieser Berechnung von Schaf 96 resorbiert  $\frac{2}{660}$  =  $\frac{1}{330}$ .

Selbst wenn wir die Berechnung mit quantitativ stärkstem Ergebnis zugrunde legen, ist die Resorption der direkt ge-reichten großen Antitoxinmenge im Vergleich mit den indirekten Versuchen sehr gering (6mal geringer).

### 3. Versuch.

Schaf 33, unbekannten Alters, zum vierten Mal gravid, wirft am 23. Febr. 1909 ein gesundes Bocklamm (No. 101). Dem Muttertier wird sofort nach der Geburt des Jungen eine Blut- und Milchprobe abgenommen und auf Antitoxin geprüft.

a) Prüfung von Serum und Milch Schaf 33 vom 23. Febr. 1909.

Maus No.	Gewicht g	Gift-dosis	Milch- bzw. Serum-dosis	Ergebnis
6372	16,0	0,00007 ccm	—	mäßiger Tetanus, erholt sich
6380	15,0	0,00007 „	0,3 ccm Milch	zieml. starker Tet., erholt sich
6382	15,0	0,00007 „	0,2 „ Serum	zieml. starker Tet., erholt sich

Blut und Milch von Schaf 33 waren also tetanusanti-toxinfrei.

Das neugeborene Schaf 101 erhält sofort nach der Geburt und von da ab täglich bis zum 1. März 1909 7,5 ccm Tetanus-ballonserum = 41,25 AE pro Tag, insgesamt also 288,75 AE.

Am 2. März wird eine Blutprobe des Schafes 101 geprüft.

b) Prüfung des Serums Schaf 101 vom 2. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumdosis	Ergebnis
6431	13,0	0,005 ccm	0,3 ccm	glatt
6416	13,0	0,008 „	0,3 „	† nach 60 Stunden

1 ccm des Serums von Schaf 101 enthielt also ca.  $\frac{1}{350}$  AE. Schaf 101 wog am 2. März 6000 g, sein Gesamtblut enthielt also  $\frac{300}{350}$  AE =  $\frac{3}{3,5}$  AE, resorbiert wäre danach  $\frac{1}{840}$ . — Legen wir die Berechnung nach dem Versuch an Schaf 99 (siehe bei dem vorigen Versuch) zugrunde, so wäre resorbiert  $\frac{1}{170}$ .

Also auch bei diesem mit großen Mengen direkt gereichten Antitoxins gefütterten Schafe ist das quantitative Ergebnis ungleich geringer als bei den indirekt gefütterten Tieren (ca. 5mal).

#### 4. Versuch.

Schaf 60 wirft am 2. März 1909 ein gesundes Bocklamm (No. 103) von 3000 g Gewicht. Der Versuch wird genau angestellt wie der vorhergehende Versuch bei Schaf 33 bzw. 101.

a) Prüfung der Blut- und Milchprobe von Schaf 60 vom 2. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serum- bzw. Milchdosis	Ergebnis
6422	10	0,00008 ccm	—	† nach $5\frac{1}{2}$ Tagen
6421	13	0,00008 „	0,3 ccm Serum	† nach $4\frac{1}{2}$ Tagen
6417	13	0,00008 „	0,3 „ Milch	† nach 6 Tagen

Blut und Milch von Schaf 60 sind also tetanusantitoxinfrei.

b) Prüfung des Serums von Schaf 103 am 9. März 1909 (nach 7-tägiger direkter Fütterung mit insgesamt 288,75 AE).

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumdosis	Ergebnis
6450	13	0,008 ccm	0,3 ccm	glatt
6465	12	0,008 „	0,2 „	† nach 66 Stunden

1 ccm des Serums Schaf 103 enthielt also pro Kubikzentimeter etwa  $\frac{1}{250}$  AE, das Gesamtblut des am 9. März 4000 g schweren Schafes also  $\frac{300}{250}$  AE =  $\frac{4}{5}$  AE. Es wären also resorbiert von den insgesamt verfütterten 288,75 AE =  $\frac{1}{860}$ .

Wenn wir die obige Berechnung an Schaf 99 (vergl. 2. Versuch) zugrunde legen, so wäre resorbiert  $\frac{1}{125}$ . Wir hätten also bei Schaf 103 unter den direkt gefütterten noch die stärkste Antitoxinresorption gehabt. Immerhin ist sie noch bedeutend geringer (ca. 4mal) als bei den indirekt gefütterten, zumal wenn wir uns erinnern, daß wir bei den indirekt gefütterten die Menge des resorbierten Antitoxins absichtlich noch geringer angenommen haben, als in Wirklichkeit es wohl der Fall ist.

### III. Indirekte Antitoxinfütterung, am 3. Tage nach der Geburt beginnend.

#### 1. Versuch.

Schaf 34, zum vierten Mal gravid, wirft am 19. Febr. 1909 zwei gesunde Schaflämmer (97 und 98) von je 2000 g Gewicht. Dem Muttertier wird sofort nach der Geburt der Jungen eine Blut- und Milchprobe abgenommen und auf Antitoxin geprüft.

#### a) Prüfung von Serum und Milch von Schaf 34.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Milch- bzw. Serumdosis	Ergebnis
6354	15	0,00007 ccm	—	starker Tetanus, erholt sich
6358	17	0,00007 „	0,3 ccm Serum	starker Tetanus, erholt sich
6359	15	0,00007 „	0,3 „ Milch	starker Tetanus, erholt sich

Blut und Milch von Schaf 34 waren also unmittelbar nach der Geburt antitoxinfrei. Dann erhält Schaf 34 52 ccm Tetanusballonserum subkutan. Nach 48 Stunden wird dem Muttertier eine Milchprobe abgenommen und auf Antitoxin geprüft.

#### b) Prüfung der Milch von Schaf 34 vom 21. Febr. 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Milchdosis	Ergebnis
6366	14,5	0,00007 ccm	—	† nach 7 Tagen
6360	14,0	0,00007 „	0,3 ccm	glatt
6377	13,0	0,003 „	0,3 „	glatt
6383	14,5	0,005 „	0,3 „	Spur Tetanus, erholt sich
6361	15,0	0,007 „	0,3 „	† nach 54 Stunden

Es enthielt also 1 ccm der Milch ca.  $\frac{1}{450}$  AE.

Die beiden jungen Schafe wurden dauernd mit der Milch genährt. Da in Betracht kommende Antitoxinmengen in die Milch erst 48 Stunden nach subkutaner Injektion des Muttertieres übergehen, wären sie etwa vom Beginn des dritten Tages ab mit Antitoxin gefüttert worden.

Unter der Annahme, daß sie dabei täglich ungefähr je 200 ccm Milch aufgenommen haben, wären insgesamt an jedes der Tiere verfüttert worden bis zum Datum der Blutprüfung am 28. Febr. 1909  $\frac{7 \times 200}{450} = \text{ca. } 3 \text{ AE}$ . Die Prüfung des Serums von Schaf 97 und 98 ergab folgendes:

c) Prüfung von Serum Schaf 97 und 98 vom 28. Febr. 1909.

Maus No.	Gewicht g	Gift-dosis	Serum-dosis	Ergebnis.
6401	13,0	0,0001 ccm	—	† nach 3 Tagen
6429	13,0	0,0001 „	0,3 Serum 97	† nach 4 1/2 Tagen
6428	13,0	0,0001 „	0,3 Serum 98	† nach 7 Tagen

Es sind also höchstens Spuren von Antitoxin in das Blut der indirekt mit Antitoxin gefütterten Neugeborenen übergegangen.

## 2. Versuch.

Schaf 70, zum ersten Mal gravid, wirft am 25. Februar 1909 ein schwaches Bocklamm von 2000 g. Dem Muttertier wird sofort nach der Geburt des Jungen eine Blut- und Milchprobe abgenommen und auf Tetanusantitoxin geprüft.

a) Prüfung von Blut und Milch Schaf 70 vom 25. Febr. 1909.

Maus No.	Gewicht g	Gift-dosis	Milch- bzw. Serum-dosis	Ergebnis
6389	14,0	0,00007 ccm	—	Mäßiger Tetanus, erholt sich
6390	15,0	0,00007 „	0,3 ccm Milch	Mäßiger Tetanus, erholt sich
6385	14,0	0,00007 „	0,3 „ Serum	Mäßiger Tetanus, erholt sich

Blut und Milch von Schaf 50 waren also tetanusantitoxinfrei.

Am 26. Februar erhält das Muttertier eine Injektion von 50 ccm Tetanusballonserum; 48 Stunden später wird eine Milchprobe auf Antitoxin geprüft.

b) Prüfung der Milch von Schaf 70 am 28. Febr. 1909.

Maus No.	Gewicht g	Gift-dosis	Milch-dosis	Ergebnis
6405	11	0,003 ccm	0,3 ccm	glatt
6406	14	0,005 „	0,3 „	geringer Tetanus, erholt sich
6407	11	0,007 „	0,3 „	† nach 36 Stunden

Es enthielt also 1 ccm der Milch ca.  $\frac{1}{500}$  AE.

Das Junge wurde dauernd von der Mutter gesäugt, das Muttertier läßt allerdings das Junge nicht recht saugen. Eine Blutprobe des Jungen vom 7. März 1909 hat folgendes Ergebnis:

## c) Prüfung des Serums von Schaf 102 vom 7. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumdosis	Ergebnis
6438	12,5	0,0001 ccm	—	† nach 4 $\frac{1}{2}$ Tagen
6454	12,5	0,0001 „	0,3 ccm Serum	† nach 4 $\frac{1}{2}$ Tagen

Es ist also bei diesen indirekt mit Antitoxin gefütterten Tieren keine Spur des Antitoxins übergegangen.

Ein Vergleich dieser beiden Versuche mit indirekter Antitoxinfütterung vom 3.—4. Tage ab mit den unter I bezeichneten Versuchen ergibt, daß beim jungen Schaf die Möglichkeit der Resorption in Betracht kommender Mengen von Antitoxin nur für die allerersten Lebenstage zutrifft. Die Nichtresorption in späterer Zeit kann dabei nicht etwa auf den geringeren Antitoxingehalt der Milch bezogen werden; denn die sowohl bei Schaf 70 als bei Schaf 34 verfütterten Antitoxinmengen sind nicht unbeträchtliche, bei Schaf 34 ca. 3,5 AE bei Schaf 70 nur etwas weniger. Hätte die Antitoxinresorption nur annähernd den Versuchen unter I entsprochen, so hätten deutlich nachweisbare Mengen Tetanusantitoxin im Blute der Neugeborenen 102 bzw. 97 und 98 vorhanden sein müssen.

Es bestätigen somit diese Versuche von neuem die schon früher durch Römer (3) vertretene Ansicht, daß der Magen-darmkanal des Neugeborenen mit wachsendem Alter undurchlässiger für Antitoxin wird.

#### IV. Versuche mit direkter Antitoxinfütterung vom 2.—3. Tage ab.

##### 1. Versuch.

Schaf 59, zum zweiten Mal gravid, wirft am 8. März 09 ein gesundes Mutterlamm (No. 106).

##### a) Prüfung von Milch und Serum des Schafes 59 unmittelbar nach dem Lamm.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Milch- bzw. Serumdosis	Ergebnis
6448	12,0	0,00008 ccm	—	† nach 7 Tagen
6447	13,0	0,00008 „	0,3 ccm Milch	† nach 7 Tagen
6446	13,5	0,00008 „	0,3 „ Serum	† nach 6 $\frac{1}{2}$ Tagen

Blut und Milch von Schaf 59 waren antitoxinfrei.

Das neugeborene Schaf 106 erhält vom 10. März 1909 früh morgens, d. h. von der 40. Lebensstunde ab, täglich 0,2 Tetanusballonserum stomachal, d. h. pro Tag 1,1 AE, im ganzen 7mal (7,7 AE).

b) Prüfung des Serums von Schaf 106 vom 17. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumosis	Ergebnis
6488	13	0,00008 ccm	—	† nach 8 Tagen
6493	13	0,00008 „	0,3 ccm Serum	† nach 7 Tagen

Es ist keine Spur von Tetanusantitoxin durch die Fütterung übergegangen.

## 2. Versuch.

Schaf 58, zum dritten Mal gravid, wirft am 9. März ein gesundes Bocklamm (No. 108). Der Versuch wird genau angestellt wie bei Schaf 59 bzw. Schaf 106.

a) Prüfung von Milch und Serum von Schaf 58 vom 9. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Milch- bzw. Serumosis	Ergebnis
6448	12	0,00008 ccm	—	† nach 7 Tagen
6458	12	0,00008 „	0,3 ccm Milch	† nach 6 Tagen
6459	11	0,00008 „	0,3 „ Serum	† nach 7 $\frac{1}{2}$ Tagen

b) Prüfung des Serums von Schaf 108 vom 18. März 1909.

Maus No.	Gewicht g	Giftosis	Serumosis	Ergebnis
6495	13	0,00009 ccm	—	† nach 5 Tagen
6496	13	0,00009 „	0,3 ccm Serum	† nach 4 $\frac{1}{2}$ Tagen

Durch die Fütterung mit direktem Antitoxin ist keine Spur Tetanusantitoxin übergegangen.

Wenn wir die Versuche unter IV mit denen unter II in Vergleich setzen, so ergibt sich auch hier wiederum, daß der Magendarmkanal des Neugeborenen mit wachsendem Alter für Antitoxin undurchlässiger wird. Es ergänzen somit die Versuche mit direkter Antitoxinfütterung den oben angestellten Vergleich zwischen den Versuchsreihen I und III wirksam.

Worauf wir besonderen Wert legen ist, daß somit auch an Schafen erwiesen ist, daß das gleiche Antitoxin von neugeborenen Schafen ungleich besser resorbiert wird, wenn wir es ihnen indirekt reichen, d. h. auf dem Umwege durch den Mutterkörper, als wenn wir es direkt in entsprechenden Quanti-

täten der Muttermilch außerhalb des Tierkörpers zumischen. Erst durch eine beträchtliche Ueberfütterung mit direktem Antitoxin können wir bei Neugeborenen den gleichen Resorptionseffekt erzielen, wie bei indirekter Fütterung mit Milch-antitoxin — ein Beweis wiederum dafür, wie schwer es ist, das Vorgehen der Natur künstlich nachzuahmen.

Praktisch ergeben sich die nunmehr wohl gesetzmäßig feststehenden Tatsachen, daß

1) der Magendarmkanal des Neugeborenen in den ersten Lebenstagen bedeutend durchlässiger für Antitoxin ist, als in späterer Zeit und daß

2) die intestinale Antitoxinresorption *ceteris paribus* bedeutend größer ist, wenn wir dem betreffenden säugenden Muttertier das antitoxische Serum subkutan injizieren, als wenn wir es direkt an das Neugeborene verfüttern; denn im letzteren Fall ist ein quantitativ entsprechender Immunisierungseffekt nur möglich bei einer in gesundheitlicher Richtung nicht ganz unbedenklichen Ueberfütterung des Neugeborenen mit artfremdem antitoxischem Serum. Es besitzt anscheinend die Milchdrüse das eigenartige Vermögen, injiziertes Serumantitoxin in einer Form dem Neugeborenen zugänglich zu machen, in welcher es leichter imstande ist, in dessen Blut überzugehen.

#### Zusammenfassung.

1) Die Möglichkeit einer intestinalen Resorption von nachweisbaren Antitoxinmengen beschränkt sich bei neugeborenen Schafen auf die beiden ersten Lebenstage.

2) Vom dritten Lebenstage ab resorbiert der Magendarmkanal neugeborener Schafe in Form von Pferdeserum der Muttermilch zugemischtes „direktes“ Antitoxin kaum mehr in nachweisbaren Mengen. Von indirekt gereichtem (d. h. nach subkutaner Seruminjektion des säugenden Muttertieres in die Milch übergegangenem) Antitoxin werden vom dritten Lebenstage ab höchstens noch Spuren resorbiert.

3) Es besteht ein beträchtlicher quantitativer Unterschied in der Stärke der antitoxischen Resorption auch bei Verwendung des gleichen antitoxischen Pferdeserums, je nachdem dasselbe den neugeborenen Schafen „direkt“ (der Muttermilch

zugemischt) oder indem es „indirekt“ (durch Seruminjektion der säugenden Mutter) verfüttert wird. Die Resorption des indirekt gereichten Antitoxins ist die quantitativ beträchtlichere.

4) Für praktische Versuche einer antitoxischen Immunisierung auf intestinalem Wege ergibt sich daher, daß es ratsamer ist, dem Neugeborenen antitoxische Muttermilch zu reichen, die ihrerseits einer Injektion der Mutter bzw. Amme ihren Antitoxingehalt verdankt, als direkt dem Neugeborenen antitoxisches Serum zu verfüttern. Durch direkte intestinale Verfütterung ist ein quantitativ der indirekten Fütterung gleicher Immunisierungseffekt nur durch eine gewaltsame Ueberfütterung mit antitoxischem Serum zu erreichen. Endlich ist ein um so stärkerer Immunisierungseffekt durch intestinale antitoxische Immunisierung zu erhoffen, je frühzeitiger dieselbe erfolgt.

#### Literatur.

- 1) Hamburger, Ueber Eiweißresorption bei der Ernährung. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 65.
- 2) Much, Ueber die antitoxische Funktion und Eiweiß. Münch. med. Wochenschr., 1907, 52.
- 3) Römer, Weitere Studien zur Frage der intrauterinen und extrauterinen Antitoxinübertragung von der Mutter auf ihre Nachkommen. Beitr. z. exper. Therapie, Heft 9, 1905.
- 4) Römer und Much, Antitoxin und Eiweiß. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 63, Heft 6.
- 5) — — Ueber intestinale Antitoxinresorption. Sitz.-Ber. d. Gesellsch. z. Beförd. d. ges. Naturw. Marburg, 1906, 5.
- 6) Römer, Experimenteller Beitrag zur Bewertung der natürlichen Säuglingsernährung. Sitz.-Ber. d. Gesellsch. z. Beförd. d. ges. Naturw. Marburg, 1908, 6.
- 7) — — Ueber normale Antitoxine. Ibidem 1908, 8.
- 8) — — Ueber die intestinale Resorption von Serumantitoxin und Milch-antitoxin. Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 1.
- 9) — — Ueber das Vorkommen von Tetanusantitoxin im Blute normaler Rinder. Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 1.
- 10) Salge, Ueber den Durchtritt des Antitoxins durch die Darmwand des menschlichen Säuglings. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 60, Heft 1.



*Nachdruck verboten.*

[Aus Statens Seruminstitut Kopenhagen;  
Direktor: Dr. Th. Madsen.]

### **Studien über Toxinbildung.**

Von **L. E. Walbum**,  
Assistenten des Instituts.

Mit 1 Figur und 3 Kurven im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Juni 1909.)

Es wurde vor 3 Jahren von Madsen und Walbum gefunden, daß sich im „Pepton Witte“ eine alkohollösliche Substanz mit starker neutralisierender Wirkung auf das Tetanolysin findet<sup>1)</sup>. Außer anderen Peptonpräparaten wurde das „Pepton Chapoteaut“ auf entsprechende Weise untersucht; ein gleicher Stoff ließ sich aber in diesem Präparate nicht nachweisen.

Wegen oben erwähnter Beobachtung würde es von Interesse sein, die Wirkung der Peptone (und besonders des „Pepton Witte“) auf die Hämolsine und ihre Bildung näher zu untersuchen.

Daß die Peptone eine so bedeutende Rolle für die Bildung der Toxine spielen, ist insofern bekannt, als es wohl für fast eine Notwendigkeit gilt, bei der Darstellung der meisten starken Toxinlösungen, den Substraten, in welchen die Mikroben gezüchtet werden, ein Peptonpräparat beizufügen.

Die Untersuchungen über Peptonpräparate sind fast ausschließlich in chemischer Richtung geführt worden, der überaus großen Bedeutung zum Trotze, welche diese Präparate haben, nicht nur für wissenschaftliche Zwecke, sondern auch für die zahlreichen Institute und Fabriken in der ganzen Welt, wo Antitoxine dargestellt werden. Eine rationelle Untersuchung über die physiologische Bedeutung der Peptonbestandteile als Substratkomponente liegt bis jetzt nicht vor.

Für die hier mitgeteilten Untersuchungen hat Tetanolysin, Vibriolysin (mit *Vibrio Nasik* und *Vibrio El Tor*

1) Centralbl. f. Bakt. etc., Abt. I, Orig., Bd. 40, 1906, p. 409.

erzeugt), Staphylolysin und Megatheriolysin nebst Diphtherietoxin und Tetanospasmin Anwendung gefunden. Die Messung der Hämolsine ist mit der im Institute üblichen Technik vorgenommen worden<sup>1)</sup>. Für die Messung des Tetano- und des Vibriolysins sind Pferdeblutkörperchen, für die des Megatheriolysins Schafblutkörperchen, und schließlich für die des Staphylolysins Ziegenblutkörperchen verwendet worden. Die Konzentration der Blutkörperchenaufschwemmungen war 1 Proz. Es muß hinsichtlich des Verhaltens des verwendeten Staphylolysins den Ziegenblutkörperchen gegenüber bemerkt werden, daß die Hämolyse nicht während des zweistündigen Aufenthaltes im Wasserthermostaten bei 37° C, sondern erst bei der darauffolgenden Abkühlung im Eiskeller eintrat. Die Ablesung der Hämolyseversuche wurde nach ca. 16—20-stündigem Aufenthalt im Eiskeller bei 1 bis 3° C vorgenommen. Für die Versuche sind „Pepton Witte“ und „Pepton Chapoteaut“ verwendet worden; im nachstehenden bezeichnet Pepton immer „Pepton Witte“.

Wenn Staphylokokken auf Pepton-Bouillonagar in großen Petrischalen 3—6 Tage bei 37° C gezüchtet und die Bakterien nach Verlauf dieser Zeit abgeschabt werden, erhält man beim Reiben der Bakterien mit Kieselgur in einem Achtmörser, darauffolgender Aufschwemmung in 0,9-proz. NaCl-Auflösung und kräftiger Zentrifugierung, eine Auflösung, welche ganz von Zellen und festen Zellenbestandteilen befreit ist; diese Auflösung wirkt hämolysierend und enthält folglich Staphylolysin.

Wird einer Portion dieses Extraktes die gleiche Menge 0,9-proz. NaCl-Lösung, einer anderen Portion des Extraktes die gleiche Menge gewöhnlicher 2-proz. Peptonbouillon oder 2-proz. Peptons (in 0,9-proz. NaCl-Lösung) hinzugefügt und danach die hämolytische Wirkung der beiden Mischungen untersucht, wird es sich ergeben, daß die Mischung mit Peptonbouillon bedeutend kräftiger als die entsprechende Mischung mit NaCl-Lösung hämolysiert (Tabelle I).

---

1) Madsen, in Kraus und Levaditi, Handb. d. Techn. u. Meth. d. Immunitätsforschung.

Lysinmenge ccm	Tabelle I.	
	5 ccm Extrakt + 5 ccm 0,9-proz. NaCl-Lösung	5 ccm Extrakt + 5 ccm Peptonbouillon
0,05	100	100
0,04	80	100
0,03	55	100
0,025	45	100
0,02	17	100
0,017	3	80
0,013	0	60
0,01	0	40
0,007	0	20
0,005	0	3
	Prozent Hämolyse	

Die Ziffern der ersten Kolonne bezeichnen die angewandten Dosen der angeführten Mischungen. Die Ziffern in den beiden anderen Reihen zeigen die erreichte Hämolyse, in Prozenten ausgedrückt, an (100 Proz. = totale Hämolyse).

Es geht also aus diesem hervor, daß z. B. 0,04 ccm des Extraktes mit NaCl-Lösung gemischt die gleiche Hämolyse wie 0,017 ccm desselben mit Peptonbouillon gibt.

Es geht mithin aus diesem Versuch hervor, daß der hämolytische Wert der Lösung beim Zusatz der in hämolytischer Beziehung unwirksamen Peptonbouillon sich um 250 Proz. vermehrt hat.

Diese Beobachtung hat die Grundlage der meisten nachfolgenden Untersuchungen gebildet.

Bei der weiteren Bearbeitung der Frage zeigte es sich bald, daß der Versuch sich nicht nur mit solchen Staphylokokkenextrakten ausführen ließ. Bei einfacher Abspülung der abgeschabten Bakterien erhielt man eine hämolytische Flüssigkeit, welche sich ganz auf dieselbe Weise verhielt; auch etwas ältere Kulturen in Peptonbouillon (filtrierte oder unfiltrierte) zeigten eine gleiche Vermehrung der hämolytischen Stärke beim Zusatz vom Peptonbouillon oder Peptonlösung.

Sind die Hämolysine und Toxine primäre Sekretionsprodukte?

Vielleicht kann das obengenannte Phänomen in der Weise gedeutet werden, daß man annimmt, daß die Vermehrung der

hämolytischen Stärke von einer Hämolysinneubildung verursacht wird, und falls diese Annahme recht ist, hat man folglich mit einer extracellularen Toxinbildung zu tun.

Man hat als charakteristisch für die Toxine angeführt, daß diese unter anderem als primäre Sekretionsprodukte aufzufassen sind, womit gemeint ist, daß sie sich direkt und in fertigem Zustande aus der Bakterienzelle ausscheiden; diese Untersuchungen deuten in die Richtung, daß die Toxine vielleicht eher als wenigstens sekundäre Sekretionsprodukte aufzufassen sind, und somit aus extracellularen Prozessen im Substrat entstanden sind.

Wird die Bildung der Hämolysine und Toxine durch die Wirkung von Enzymen verursacht?

Daß die Hämolysine und Toxine mehrere Eigenschaften mit den Enzymen gemein haben, ist schon bekannt, und da überdies von verschiedenen Seiten angenommen wird, daß jene Körper von enzymatischer Natur sind, ließ es sich denken, daß sich eine Vorstufe der Lysine und Toxine findet, und zwar Körper mit zymogenartigen Eigenschaften.

Es ließ sich auch denken, die hämolysin- und toxinbildenden Prozesse mit den Vorgängen zu parallelisieren, welche z. B. bei der Vergärung der Zuckerarten vor sich gehen, dergestalt, daß die Mikroben ein Enzym mit spaltenden Eigenschaften gegenüber einem oder mehreren Bestandteilen der Peptonbouillon ausscheiden, und daß die Hämolysine und Toxine in dem Falle als auf diese Weise erschienene Spaltprodukte aufzufassen wären.

Der Gedanke an ein Zymogen im Sinne des Pepsinzymogens muß demnach aufgegeben werden, weil weder Staphylokokkenextrakte noch ältere Bouillonkulturen sich durch Behandlung mit verdünnten Säuren verstärken ließen; wie bekannt, ist dies die gewöhnliche Methode, wodurch die Zymogene (Vorstufen der Enzyme) in wirksamen Zustand überführt werden.

Die Annahme, es würde erst ein Enzym gebildet werden, welches durch Einwirkung auf das Substrat z. B. das Hämolysin abspaltete, zeigte sich auch nicht haltbar; wie bekannt, wird es von den meisten Autoren als charakteristisch für die

Enzyme angesehen, daß sie schon bei Erwärmung bis 60 bis 70° C unwirksam gemacht werden, und es stellte sich heraus, daß sich das in 2 Minuten gekochte Staphylolysin durch Zusatz von Peptonbouillon verstärken ließ, und zwar in demselben Verhältnis wie das nicht erwärmte (Tabelle II).

Tabelle II.

Lysinmenge ccm	Lysin, nicht erwärmt		Lysin, in 2 Min. gekocht	
	1 ccm Lysin + 9 ccm 0,9-proz. NaCl-Lösung	1 ccm Lysin + 9 ccm Pepton- bouillon	1 ccm Lysin + 9 ccm 0,9-proz. NaCl-Lösung	1 ccm Lysin + 9 ccm Pepton- bouillon
1,0	.	.	○	.
0,7	.	.	.	.
0,5	○	.	.	.
0,4	.	.	.	.
0,3	.	.	.	○
0,25	.	.	.	.
0,2	.	.	.	.
0,17	.	○	.	.

○ = 30 Proz. Hämolyse

Die Ziffern der ersten Kolonne bezeichnen die angewandten Dosen der angeführten Mischungen. Die Bezeichnung ○ ist bei den Dosen gebraucht, welche aus der betreffenden Mischung dieselbe Hämolyse, nämlich 30 Proz. erzeugten. Bei den späteren Versuchen von gleicher Art werden, der Raumersparnis wegen, nicht die ganze Reihe mit allen Dosen, sondern nur die Dosen, welche denselben Hämolysegrad erzeugen, angeführt worden.

Diesen Versuchen gemäß ist es unwahrscheinlich gemacht, daß der „Aktivierungsprozeß“ von enzymartigem Charakter sein kann.

Die Beobachtung kann besser gedeutet werden, wenn man folgendes annimmt: Die Mikroben erzeugen als Vorstufe des Hämolsins ein Prolysin, das ist ein in physiologischer Beziehung unwirksamer Stoff, welcher, sich mit einem oder mehreren Körpern in der Peptonbouillon vereinend, das eigentliche Hämolsin mit den für diesen Körper charakteristischen Eigenschaften bildet.

Diese hypothetischen Vorstufen werden im nachfolgenden „Prolysine“ und „Protoxine“ genannt.

Die aktivierende Wirkung der Peptonbouillon rührt größtenteils von dem hinzugefügten Pepton her; die Bouillon ohne

Pepton hat auch eine aktivierende Wirkung, aber nur in verhältnismäßig geringem Grade.

Warum finden sich Prolysine in Kulturen mit großem Inhalt von Pepton?

Fragt man, wie die Anwesenheit dieser Prolysine in den Kulturen erklärt werden kann, obgleich sich ca. 2 Proz. Pepton im Substrate findet, und warum die Prolysine durch die schon anwesenden Peptone nicht aktiviert sind, dann kann man sich denken, daß in dieser Peptonmenge nicht genügend für die Aktivierung des von den Mikroben gebildeten Prolysins zugegen war. In dieser Richtung deutet folgender Versuch:

Wenn man eine eintägige, in Peptonbouillon gezüchtete Staphylokokkenkultur, in welcher die Hämolyisinproduktion noch in vollem Gange ist, nimmt, und außerdem eine ältere Kultur (ca. 10—15 Tage alt), wo die Hämolyisinbildung längst beendet ist, und dann den beiden Peptonbouillon hinzufügt, wird es sich zeigen, daß die ältere Kultur danach bedeutend stärker als vorher hämolysiert, während die hämolytische Stärke der jungen Kultur nicht oder nur unbedeutend vergrößert geworden ist. In der jungen Kultur findet sich somit noch ein Ueberschuß von aktivierender Substanz, in der älteren ist diese Substanz dagegen völlig verbraucht, und es finden sich überschüssige Prolysine.

Welche Rolle spielt die Peptonkonzentration in den Kulturen für die Bildung der Prolysine und Lysine?

Da das aktivierende Vermögen des Substrates, wie oben erwähnt, größtenteils an das hinzugesetzte Pepton geknüpft ist, war es naheliegend, die Bedeutung der Peptonmenge näher zu untersuchen.

Wenn die Peptonmenge der Kultur vergrößert wird, möchte man annehmen, daß jene ein Maximum erreichen dürfte, wo genügendes Pepton vorhanden wäre, um alles Prolysin zu aktivieren, dergestalt, daß die Kultur sich durch weiteren Peptonzusatz nicht verstärken ließe.

Um dieses zu untersuchen, wurden einige Versuche mit Zucht von Staphylokokken in Bouillon mit verschiedenem In-

halt von Pepton unternommen; nach 14-tägigem Aufenthalte im Thermostaten (37° C) wurden sämtliche Kulturen herausgenommen und ihre hämolytische Stärke untersucht, teils vor, teils nach Zusatz einer großen Peptonmenge.

Das Resultat dieser Untersuchungen findet sich in Tab. III. Lysineinheiten bezeichnen hier die kleinste Menge der betreffenden Lysinlösung, welche, um totale Hämolyse zu erzeugen, nötig ist (8 ccm einer 1-proz. Aufschwemmung von Ziegenblutkörperchen).

Tabelle III.

‰ Pepton in der Kultur	Ohne Pepton Lysineinheiten pro ccm	Mit Pepton Lysineinheiten pro ccm	Vermehrung der Lysinmenge in Proz.
0	5	6	18
0,01	12	14	22
0,05	29	44	55
0,1	100	364	264
0,5	143	588	311
1	222	1000	350
5	1000	2222	122
10	667	1250	87
20	541	667	23

Aus diesem Versuch geht es hervor, daß die Bildung von Hämolysin nur bis zu einem gewissen Grade mit steigenden Peptonmengen zunimmt, und wenn die Peptonkonzentration 5-proz. ist, wird die größte Hämolysinkonzentration erreicht; daß sich in den Kulturen mit sehr großem Inhalt von Pepton weniger Hämolysin als in den Kulturen mit weniger Pepton findet, erklärt sich dadurch, daß die Staphylokokken nur schlecht in dem konzentrierten Substrate gedeihen. Aus der Tabelle geht es überdies hervor, daß sich in allen Kulturen bei weiterem Zusatz von Pepton bedeutende Prolysinmengen nachweisen lassen; das Maximum findet sich auch hier bei 5-proz. Pepton in der ursprünglichen Kultur. In den Kulturen mit 10- und 20-proz. Pepton finden sich auch ziemlich große Prolysinmengen, welche dem großen Inhalt von Pepton zum Trotze nicht aktiviert worden sind.

Daß in diesen Kulturen mit 10- und 20-proz. Pepton noch Prolysin, welches nicht aktiviert ist, sich findet, läßt sich mit der geschilderten Annahme nicht in Einklang bringen.

Wie ereignet sich die Hämolyisinbildung in einer Staphylokokkenkultur?

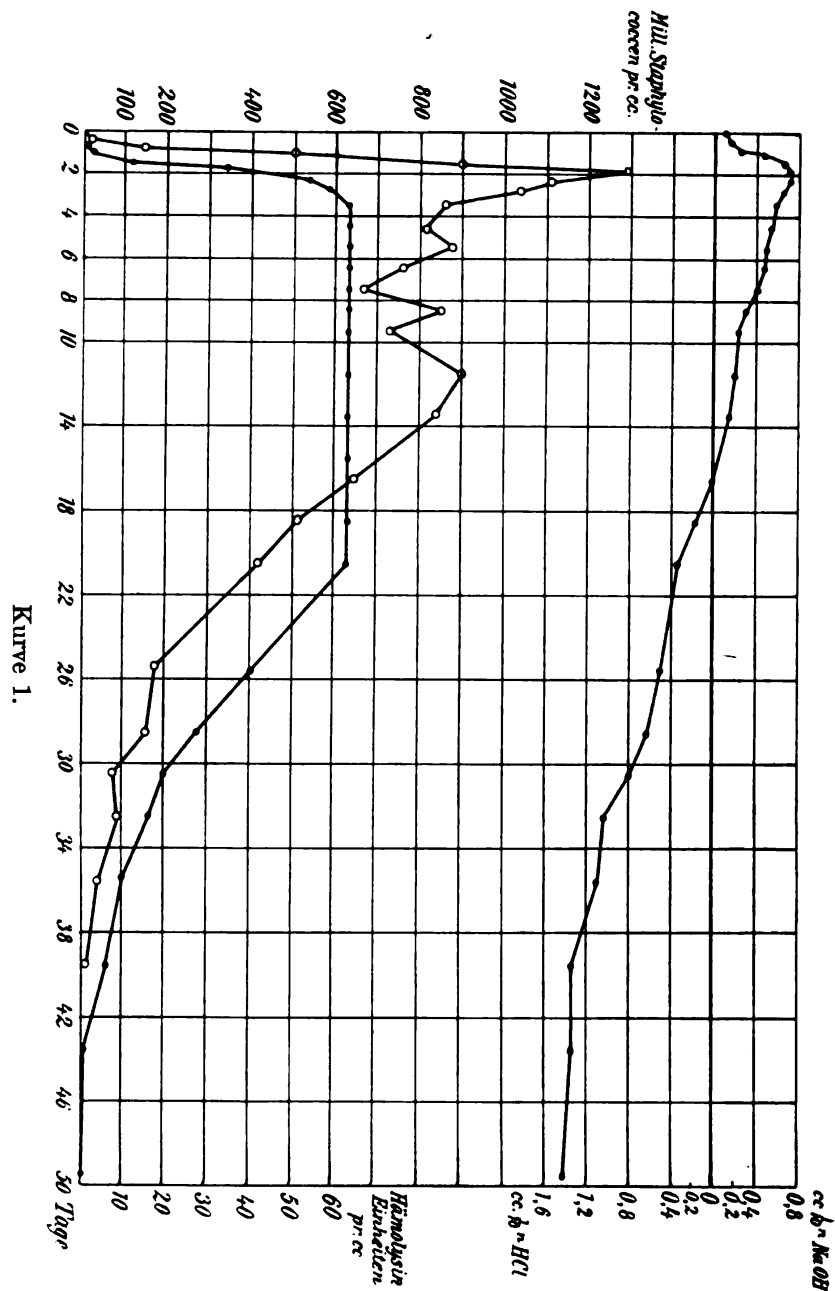
Den vorliegenden Untersuchungen zufolge läßt es sich denken, daß die Hämolyisinbildung folgendermaßen vor sich geht: Die Mikroben erzeugen während des Wachstums das in physiologischer Beziehung unwirksame Prolysin, welches sich sofort mit dem aktivierenden Körper des Substrates verbindet und dadurch das Hämolyisin bildet; allmählich wird mehr Prolysin ausgeschieden und dadurch auch mehr Hämolyisin gebildet, bis die ganze Menge aktivierender Substanz verbraucht ist; wenn dieser Punkt erreicht ist, muß die Hämolyisinbildung notwendigerweise innehalten; die Mikroben setzen indessen die Prolysinbildung fort, was sich leicht, wie früher erwähnt, durch weiteren Zusatz von aktivierendem Stoff nachweisen läßt. Auf diese Weise wird die flache Form der Hämolysinkurve leicht verständlich (Kurve 1 auf p. 78).

Der Versuch ist mit Staphylokokken, welche bei 37° C in Peptonbouillon gezüchtet sind, ausgeführt worden. In den zu den angeführten Zeiten herausgenommenen Kulturproben ist eine zahlenmäßige Bestimmung der entwicklungsfähigen Staphylokokken unternommen worden, und außerdem eine Messung der hämolytischen Stärke, nebst einer Titrierung der Alkali- bzw. Säuremenge. Es geht daraus hervor, daß das Hämolyisin sich schon nach Verlauf von 17 Stunden in der Kultur nachweisen läßt und daß diese Produktion schnell mit dem Wachstum der Staphylokokken steigt. Nach 60 Stunden fängt die Zahl der Staphylokokken an abzunehmen, während die Hämolyisinproduktion erst nach Verlauf von ca. 84 Stunden aufhört. Aus der obersten Kurve ergibt es sich, daß der Säuregrad der Kultur im Verlaufe der zwei ersten Tage ganz beträchtlich steigt, worauf es wieder langsam bis zum 17. Tage abnimmt, und nach Verlauf dieser Zeit wird die Reaktion alkalisch (Phenolphthaleïn).

Es ist bekannt, daß Alkalien destruierend auf die Toxine und Hämolysine wirken, und es geht auch aus der Hämolysinkurve hervor, daß nach 21 Tagen, wo die Alkalimenge etwas mehr gestiegen ist, die Destruktion des Hämolysins anfängt; gleichzeitig erfährt die Zahl der Staphylokokken eine große Abnahme.



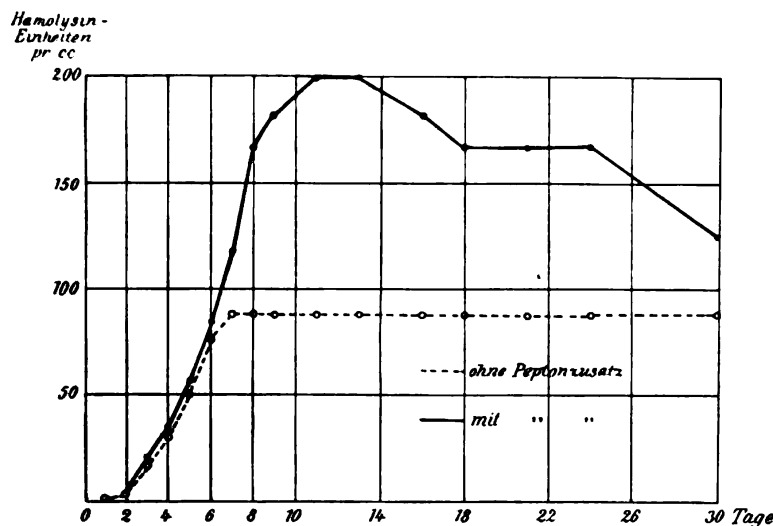
Nach ca. 40—45 Tagen ist die Kultur steril und nach ca. 45—50 Tagen ist alles Hämolyysin destruiert worden.



Die flache Form der Hämolyysinkurve sollte also, der angeführten Hypothese gemäß, von fehlenden Aktivierungssub-

stanzen herrühren; bei weiterem Peptonzusatz zu den herausgenommenen Kulturproben dürfte das Prolysin aktiviert werden und somit die hämolysischen Werte vergrößert werden.

Um dieses zu untersuchen, wurde ein ähnlicher Versuch ausgeführt. Das hämolysische Vermögen der mit eintägigen Zwischenräumen herausgenommenen Kulturproben zeigte eine Kurve, deren Verlauf ganz derselbe wie in Kurve 1 war, und es stellt sich heraus, als die Messung nach Zusatz von Pepton zu den Proben vorgenommen wurde, daß die Kurve, wie vorausgesehen, eine ganz geänderte Form erhielt (Kurve 2).



Kurve 2.

Die punktierte Linie gibt die Hämolysinbildung in der Kultur an, und die ungebrochene die Hämolysinkurve nach Aktivierung des hypothetischen Prolysins.

Finden sich ähnliche Vorstufen der übrigen Hämolysine und Toxine?

Bei der Untersuchung von anderen blutlösenden Giften bakteriellen Ursprungs auf ähnliche Weise zeigte es sich, daß jedes für sich ein entsprechendes Prolysin hat. In dieser Beziehung sind nachbenannte Lysine untersucht worden: Tetano-, Megatherio-, Vibrio Nasik- und Vibrio El Tor-Lysine. Die Mengen des Prolysins waren in diesen verschiedenen Kulturen recht variierend:

Tetanolysin:	Vermehrung von 60—80 Einheiten pro ccm = 33,3 Proz.
Megatheriolysin:	„ „ 5—14 „ „ „ = 180 „
Vibrio Nasik-Lysin:	„ „ 20—35 „ „ „ = 75 „
Vibrio El Tor-Lysin:	„ „ 77—150 „ „ „ = 95 „

Da es gelang, Prolysine der untersuchten Hämolysine nachzuweisen, ließe es sich vielleicht denken, daß dieses Verhältnis eine allgemeine Regel wäre, und daß somit etwa alle Bakteriengifte auf entsprechende Weise aufgebaut wären. Um zu untersuchen, ob den Toxinen entsprechende Protoxine vorhanden sind, wurden Diphtherie- und Tetanuskulturen untersucht, und wie aus folgendem Versuche (Tabelle IV) ersichtlich ist, ist die Anwesenheit solcher Protoxine wahrscheinlich gemacht.

Tabelle IV.

Diphtherietoxin				Tetanospasmin.			
0,004 ccm Toxin + 2 ccm 0,9 Proz. NaCl- Lösung		0,004 ccm Toxin + 2 ccm 10 Proz. Pepton- lösung		0,004 ccm Toxin + 2 ccm 0,9 Proz. NaCl- Lösung		0,004 ccm Toxin + 2 ccm 10 Proz. Pepton- lösung	
Dat.	Meerschweinch. Gew. in g etc.	Dat.	Meerschweinch. Gew. in g etc.	Dat.	Meerschweinch. Gew. in g etc.	Dat.	Meerschweinch. Gew. in g etc.
20. II.	240 Injektion	20. II.	240 Injektion	10. II.	300 Injektion	10. II.	300 Injektion
22. II.	220 große Infiltration	22. II.	195 sehr große Infiltrat., krank	13. II.	305 schwach. Tet.	13. II.	305 schwach. Tet.
23. II.	225 Inf. kleiner geworden	23. II.	200 sehr große Infiltrat., krank	15. II.	300 starke Tetan.	15. II.	285 sehr starke Tetan.
24. II.	240 Infiltr. unbedeutend	24. II.	200 sehr große Infiltrat., krank	18. II.	300 starke Tetan.	18. II.	275 sterbend
25. II.	240 Infiltr. unbedeutend	25. II.	† 5 Tage	20. II.	305 Tetan. abnehmend		† 8 Tage.
27. II.	250 keine Infiltr.			27. II.	310 schwach. Tet.		

Die Mischungen standen eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur vor der Injektion an Meerschweinchen. Den Kontrollmeerschweinchen wurde dieselbe Peptonmenge injiziert, ohne irgend ein Symptom hervorzurufen. Der Ausschlag in diesen Versuchen ist nicht so groß wie für die Hämolysine, es geht aber jedenfalls in derselben Richtung und deutet auf die Existenz der Protoxine.

### Die chemischen und physikalischen Verhältnisse der Prolysine und Protoxine.

Nach den vorliegenden Untersuchungen zu urteilen, darf das Toxin(Lysin-)molekül als durch gegenseitige Einwirkung von wenigstens zwei Komponenten, der Bakterienkomponente (Protoxin) und der Peptonkomponente, entstanden angesehen werden, und man dürfte wohl annehmen, daß der Kern des Toxin(Lysin-)moleküls in der ersten dieser Komponenten enthalten sei, und daß diese Komponente folglich dem Toxin ihre spezifischen Eigenschaften gibt, während die zuletzt erwähnte Komponente als der aktivierende Teil betrachtet werden könne, welcher notwendig sei, damit das Giftmolekül seine Eigenschaften entfalten könne.

Wie bekannt, finden sich auch andere ungiftige Giftmodifikationen, nämlich die Ehrlichschen Toxoide. Die Prolysine mit diesen zu identifizieren, scheint unter anderem aus folgenden Gründen schwierig zu sein:

- 1) Die Prolysine können aktiviert werden.
- 2) Es scheint, als ob die Prolysine nicht als Antigene auftreten können.
- 3) Die Prolysine vermögen nicht die Antilysine der entsprechenden Lysine zu binden.

Da es nicht gelungen ist, die Prolysine von den Lysinen quantitativ zu trennen, ist es natürlicherweise schwierig, sich über die antigenen Eigenschaften der ersteren auszusprechen. Wenn man eine Ziege vermitteltst eines Staphylolysins, welches auch Prolysin enthält, immunisiert, und mit dem erhaltenen Antilysin einen Neutralisationsversuch, mittelst desselben für die Immunisierung angewandten Prolysin-Lysins unternimmt, wird es sich zeigen, daß die Lysinwirkung auf gewöhnliche Weise mit steigenden Antilysindosen herabgesetzt wird, wogegen die Prolysinmenge immer dieselbe bleibt.

Wird eine genau bestimmte Antilysinmenge einer Mischung von äquivalenten Lysin (-Prolysin) und Antilysinmengen hinzugefügt, kann man, nach halbstündigem Stehenlassen bei 37 ° C, die ganze zuletzt hinzugefügte Antilysinmenge mit Sicherheit nachweisen, und das Prolysin kann folglich kaum große antilysinbindende Eigenschaften besitzen.

Es wäre natürlich von großem Interesse, das Prolysin vom Lysin trennen zu können, denn in dem Falle würde vielleicht Klarheit in die Natur und Eigenschaften dieser unbekannten Körper gebracht werden. In der Absicht habe ich einige Versuche unternommen. Erstens habe ich es versucht, diese Körper durch Dialysation voneinander zu trennen:

100 ccm Staphylolysin dialysierte 2 Tage bei ca. 5° C. Außerhalb der Membran wurde destilliertes Wasser (10 ccm) untergebracht. Die hämolytischen Eigenschaften des Dialysats wurden teils ohne, teils mit Peptonzusatz untersucht (Tabelle V).

Tabelle V.

Dialysat 5 ccm + NaCl-Lösung 5 ccm		Dialysat 5 ccm + 10 Proz. Peptonlösung 5 ccm	
Dosis	Hämolyse in Proz.	Dosis	Hämolysin in Proz.
1,0	10	1,0	100
0,7	3	0,7	90
0,5	0	0,5	90
0,4	0	0,4	80
0,3	0	0,3	50
		0,25	45
		0,2	30
		0,17	25
		0,13	22
		0,1	10
		0,07	6
		0,05	0

Durch Aktivierung des im Dialysate anwesenden Prolysin wurde somit die hämolytische Stärke zehnmal vergrößert. Durch Peptonzusatz zu dem ursprünglichen Lysin wurde die Stärke nur ca. 3—4mal vergrößert. Man darf somit aus diesem Versuche folgern, daß das Prolysin schneller als das Lysin dialysiert. Wenn man die Dialysation lange, z. B. 10—20 Tage vorgehen läßt, wird verhältnismäßig mehr Lysin hindurch dialysieren, so daß der Unterschied nicht so groß wie beim erwähnten Versuche wird.

Um eventuell das Prolysin vom Lysin zu trennen, habe ich die Verhältnisse dieser Körper bei fraktioniertem Ausfällen mit Ammoniumsulfat untersucht:

In einer Reihe von Gläsern mit 10 ccm Staphylolysin wurden verschiedene Mengen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gelöst, und zwar

in No. 1	10 ccm Lysin	+	3 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
" " 2	10 " "	+	4 " "
" " 3	10 " "	+	4,5 " "
" " 4	10 " "	+	5 " "
" " 5	10 " "	+	5,5 " "
" " 6	10 " "	+	6 " "

Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und 2mal gewaschen, jedesmal mit 5 ccm einer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung aus entsprechender Konzentration, darnach in 0,9-proz. NaCl-Lösung gelöst und bis 20 ccm aufgefüllt.

Die hämolytische Stärke dieser Lösungen wurde teils ohne teils mit Peptonzusatz untersucht (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Das Lysin hat mit Pepton eine Hämolsinvermehrung von 225 Proz. erhalten.

Fraktion 1	"	"	"	"	"	"	76	"	"
" 2	"	"	"	"	"	"	75	"	"
" 3	"	"	"	"	"	"	100	"	"
" 4	"	"	"	"	"	"	150	"	"
" 5	"	"	"	"	"	"	209	"	"
" 6	"	"	"	"	"	"	225	"	"

Aus diesem Versuche geht hervor, daß das Verhältnis zwischen Lysin und Prolysin nicht in allen Fraktionen dasselbe ist. Es wird bei den großen Salzmengen verhältnismäßig mehr Prolysin als bei den kleineren gefällt; das kompliziertere Lysinmolekül wird somit vorzugsweise gefällt.

Man könnte sich denken, daß es bei kleineren Salzkonzentrationen möglich wäre, ein prolysinfreies Lysin zu fällen; ich habe in der Absicht einige Versuche ausgeführt, doch es gelang mir nicht, ein absolut reines Lysin darzustellen, weil immer kleine Prolysinmengen mitfolgen.

Im Anschluß an diese Untersuchungen wurde ein Versuch mit fraktioniertem Fällen von Lysin und Prolysin ausgeführt, um festzustellen, ob diese Körper zu derselben oder zu mehreren Gruppen gehören:

500 ccm Staphylolysinlösung wurden durch Fällen mittels (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nach der später erwähnten von Pick angegebenen Methode in primäre Albumosen, Deuteroalbumose A und Deuteroalbumose B gespaltet. Diese Fraktionen wurden nach sorgfältiger Auswaschung in einer bestimmten Menge 0,9 Proz.

6\*

NaCl-Lösung gelöst, und deren Prolysingehalt auf gewöhnliche Weise untersucht.

Hierdurch hat es sich erwiesen, daß das Lysin für sich 285 Lysineinheiten pro Kubikzentimeter und 584 Prolysineinheiten nach Aktivierung enthält. Diese Lysinmengen verteilen sich dergestalt unter den verschiedenen Fraktionen (Tabelle VII):

Tabelle VII.

	Lysineinheiten pro ccm	Prolysineinheiten pro ccm
Das Lysin für sich	285	584
Primäre Albumosen	222	310
Deuteroalbumose A	54	205
„ B	12	39
Im ganzen	288	554

Es geht aus diesem Versuche hervor, daß alles Lysin und Prolysin in diesen drei Gruppen sich findet.

Man wird jedoch sofort den Unterschied bemerken, daß aus dem Lysin ca. 77 Proz. der Einheiten unter die primären Albumosen, ca. 19 Proz. unter die Deuteroalbumose A, und ca. 4 Proz. unter die Deuteroalbumose B gehören, während aus dem Prolysin nur ca. 53 Proz. unter die primären Albumosen, ca. 35 Proz. unter die Deuteroalbumose A und ca. 7 Proz. unter die Deuteroalbumose B gehören. Dieses fällt mit der Beobachtung zusammen, daß das Lysin durch Ammoniumsulfat früher als das Prolysin gefällt wird.

Es scheint, als ob das Prolysin bei der Erwärmung des Staphylolysin genau denselben Gesetzen wie das Lysin folge.

Zu welcher Gruppe von Körpern gehört die Toxinkomponente in „Pepton Witte“?

Weil die „aktivierende“ Substanz in den Peptonpräparaten, den angeführten Untersuchungen zufolge, eine überaus große, vielleicht entscheidende Rolle spielt, würde es von Bedeutung sein, deren chemische Konstitution festzustellen, oder falls dieses sich nicht machen ließe, dann zu ermitteln, welcher Gruppe von Körpern es angehört.

Ich habe in der Absicht das Pepton Witte einer Reihe von Untersuchungen unterworfen und unter anderen untenstehende Eigenschaften der Toxinkomponente in „Pepton Witte“ gefunden:

- 1) Es erträgt das Kochen.
- 2) Es erträgt das Gefrieren, jedenfalls bis  $\div 80^{\circ}$  C.
- 3) Es dialysiert verhältnismäßig leicht durch tierische Membranen und durch Pergamentpapier.
- 4) Löslich in Wasser, verdünnte Neutralsalzlösungen und im wasserfreien Glycerin.
- 5) Unlöslich in Methyl- und Aethylalkohol, Aether und Chloroform.

Um etwas näheres darüber zu erfahren, zu welcher Gruppe von Körpern diese Toxinkomponente im Pepton Witte gehört, habe ich dieses Präparat in eine Reihe Fraktionen zerlegt und diese auf ihre aktivierenden Eigenschaften untersucht. Für diese Spaltung wurde die von Pick<sup>1)</sup> angegebene Methode verwendet. Man muß jedoch erinnern, daß die Fraktionen, welche durch diese oder andere vorgeschlagene Methoden erhalten werden, wahrscheinlicherweise nicht als reine Körper betrachtet werden können, oder daß eine solche Trennung eine durchaus scharfe Grenze zwischen die verschiedenen Albumosen und Peptone setzt. Nachfolgende Fraktionen wurden untersucht:

I. Primäre Albumosen	{	Heteroalbumose	
		Acroalbumose	
		Protalbumose	
II. Sekundäre Albumosen	{	Deuteroalbumose	A
		„	B
		„	C
III. Echte Peptone	{	Pepton	A
(Amphopepton Kühne)		„	B

Aus den verschiedenen Fraktionen wurden 5-proz. Lösungen bereitet, und diese durch Staphylolysin geprüft. Das Resultat dieser Versuche ist aus Fig. 1 ersichtlich (siehe p. 86).

Aus dieser ergibt es sich, daß Heteroalbumose, Protalbumose, Deuteroalbumose A und B nebst Pepton A imstande sind „aktivierend“ auf Staphylo-Prolysin zu wirken, wogegen Deuteroalbumose C und Pepton B im Besitze lysinneutralisierenden

1) Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. 24, 28; Hofm. Beitr., Bd. 2, 481.



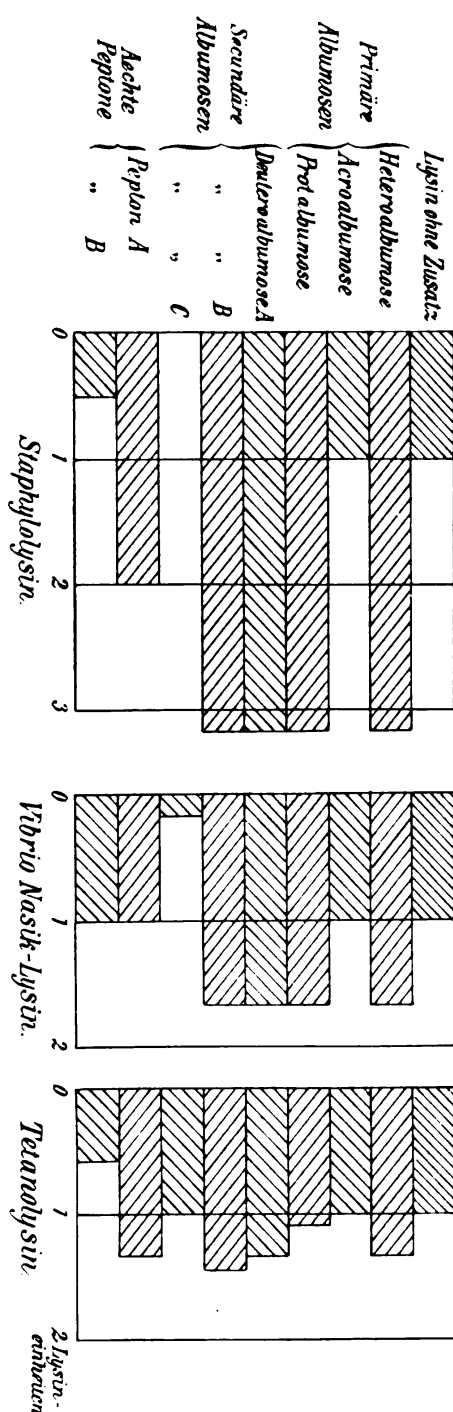


Fig. 1.

der Eigenschaften sind. Wie aus Fig. 1 hervorgeht, sind ähnliche Versuche mit *Vibrio* (Nasik) Lysin samt Tetanolysin ausgeführt worden. In Betreff des Tetanolysins rufen dieselben Gruppen wie beim Staphylolysin eine aktivierende Wirkung hervor, ebenso wie das Pepton B neutralisierende Eigenschaften besitzt. Die Deuteroalbumose C scheint hier indifferent zu sein. Beim Vibriolysin machen sich dieselben Verhältnisse geltend, doch scheint es, als ob die zwei Peptone hier ganz wirkungslos seien. Die Acroalbumose ist für alle drei Lysine ganz indifferent.

Es hat somit den Anschein, als ob das aktivierende Vermögen des „Pepton Witte“ an eine ganze Reihe von Fraktionen geknüpft sei; ob es sich hier um mehrere Körper handelt, welche diese Eigenschaft gemeinschaftlich haben oder um einen Körper, welcher sich in allen den erwähnten Fraktionen

findet, muß man vorläufig unentschieden lassen, ebenso wie man es auch vorläufig aufgeben muß, die chemischen Verhältnisse dieser Körper (resp. dieses Körpers) näher kennen zu lernen.

Von welcher Art ist der Prozeß, welcher sich bei der Umbildung des Prolysins in Lysin ereignet?

Hierüber kann man sich natürlicherweise gegenwärtig nur mit Vorbehalt aussprechen; doch sind die Enzymprozesse, wie schon erwähnt, wahrscheinlich ausgeschlossen, was mit der Tatsache zusammenfällt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Prolysin und aktivierender Substanz bei niedriger Temperatur so groß ist, daß sie durch unsere jetzigen Methoden nicht gemessen werden kann. Ich würde geneigt sein anzunehmen, daß es vielleicht ein Additionsprozeß wäre, oder ein Prozeß auf chemischen Umsätzen basiert, jedenfalls ein solcher, durch den mehrere Atome dem Prolysinmolekül zugeführt werden, weil alles darauf deutet, daß das Lysinmolekül größer und komplizierter als das Prolysinmolekül ist; wie schon erwähnt, dialysiert das Prolysin schneller als das Lysin und jenes wird schwieriger aus seiner Lösung als dieses ausgesalzen.

Es wurde im Anfange dieser Arbeit erwähnt, daß Madsen und Walbum im „Pepton Witte“ einen alkohol-löslichen Körper mit starken tetanolyisin-neutralisierenden Eigenschaften gefunden haben. Dieses Antilyisin kann durch Extraktion des „Pepton Witte“ mittelst 96-proz. Alkohol bei gewöhnlicher Zimmertemperatur dargestellt werden. Wird der alkoholische Extrakt in 0,9-proz. NaCl-Lösung überführt, trübt sich die Flüssigkeit durch unaufgelöste Partikelchen; man darf diese nicht abfiltrieren, weil dadurch ein sehr großer Teil des neutralisierenden Vermögens verschwindet. Durch nähere Untersuchung hat es sich gezeigt, daß dieser Antikörper aus „Pepton Witte“ stark neutralisierend auf Staphylolyisin, dagegen schwach auf Diphtherietoxin, Vibrio Nasik-Lysin und Vibrio El Tor-Lysin wirkte, während es keine Wirkung auf Megatheriolysin und Tetanospasmin ausübte.

Früheren Untersuchungen zufolge wußten wir, daß sich im „Pepton Chapoteaut“ ein solches Antitetanolysin nicht findet. Der alkoholische Extrakt dieses Peptonpräparats hat sich deshalb als unwirksam auf die genannten Toxine und Lysine gezeigt, außer dem Megatheriolysin, wo eine schwache Antiwirkung sich nachweisen ließ.

Ich habe es nicht näher untersucht, zu welcher Gruppe von Körpern dieser alkohollösliche Antistoff gehört; es ist aber möglich, daß es mit dem Pepton B identisch ist, denn dieses ist allerdings im Alkohol löslich, und wie wir es früher gesehen haben, im Besitze von antitetano- und antistaphylo-lytischen Eigenschaften.

Ich habe, wie oben erwähnt, außer diesem Antikörper im „Pepton Witte“ auch einen anderen, im Alkohol unlöslichen, gefunden, und zwar die Deuteroalbumose C. Die Deuteroalbumose C wirkt stark neutralisierend auf Staphylo-lysin, schwach auf El Tor-Lysin und Nasik-Lysin, wogegen sie keine Wirkung auf Tetanolysin und Tetanospasmin ausübt; dagegen ist sie imstande das Diphtherietoxin zu neutralisieren; mehrere Eiweißkörper sind unterdessen bekanntlich imstande die Wirkung des Diphtherietoxins aufzuheben, und deshalb könnte man denken, es wäre nicht eine Eigenschaft, welche spezifisch für die Deuteroalbumose C wäre; man darf wohl dennoch annehmen, daß es eine spezifische Eigenschaft ist, weil z. B. die Deuteroalbumose A kein neutralisierendes Vermögen hat, sondern überdies, wie früher erwähnt, aktivierende Eigenschaften besitzt (Tabelle VIII).

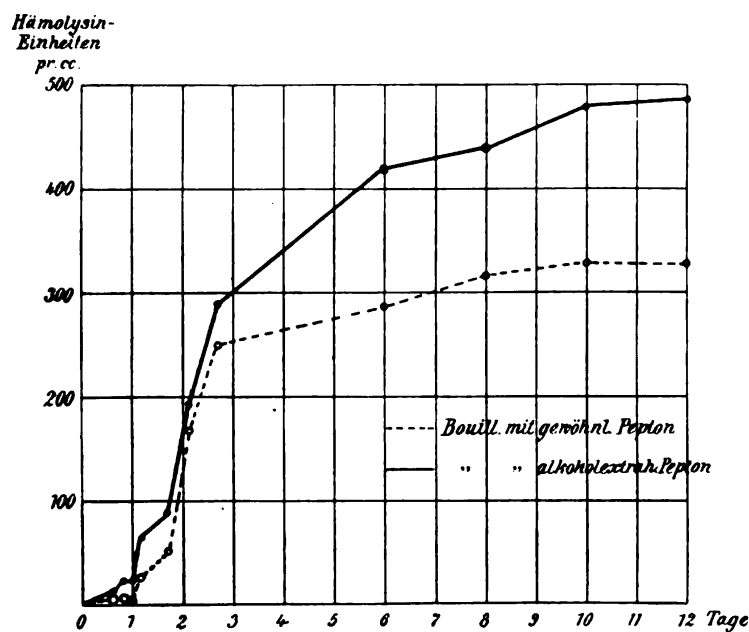
Tabelle VIII.

0,012 ccm Toxin + 2 ccm 0,9% NaCl-Lösung		0,012 ccm Toxin + 2 ccm 10% Deuteroalbumose C		0,012 ccm Toxin + 2 ccm 10% Deuteroalbumose A	
Dat.	Meerschweinchen Gew. in g etc.	Dat.	Meerschweinchen, Gew. in g etc.	Dat.	Meerschweinchen, Gew. in g etc.
5. II.	230 Injektion	5. II.	230 Injektion	9. II.	240 Injektion
6. II.	205 große Infiltr.,	6. II.	220 Infiltrat. unbed.	10. II.	215 große Infiltr.,
8. II.	180 „ 3½ Tage	8. II.	225 kleine Infiltrat.	11. II.	200 „ „ krank
		9. II.	235 Infiltrat. unbed.	13. II.	190 „ 4½ Tage „
		10. II.	245 „ „		
		11. II.	250 keine Infiltrat.		
		13. II.	255 „ „		
		18. II.	260 „ „		

Aus der Tabelle geht es hervor, daß das Meerschweinchen, an welches das Toxin allein injiziert ist, nach  $3\frac{1}{2}$  Tagen stirbt, während das Tier mit Deuteroalbumose C nur eine kleine Infiltration erhält, diese schwindet allmählich und gleichzeitig nimmt das Tier an Gewicht zu. Das Meerschweinchen, an welches Toxin + Deuteroalbumose A injiziert ist, stirbt nach  $4\frac{1}{2}$  Tagen.

Ist es möglich, durch Verwendung dieser Versuchsergebnisse stärkere Lysin- und Toxinlösungen herzustellen als unter gewöhnlichen Verhältnissen?

Durch diese Untersuchungen zeigt es sich also, daß Nahrungsflüssigkeiten mit „Pepton Witte“ nicht als ideale Substrate für die Darstellung von jedenfalls mehreren Toxinen



Kurve 3.

und Lysinen aufgefaßt werden können, weil sie außer den „aktivierenden“ Substanzen zugleich Körper enthalten, welche neutralisierend auf die gebildeten Gifte wirken. Es liegt dann

nahe, zu versuchen, ob es möglich sei, stärkere Gifte dadurch zu erhalten, daß man diese schädlichen Stoffe aus dem Substrate entfernt. Dieses läßt sich verhältnismäßig leicht machen, was die alkohollösliche Substanz betrifft, wogegen es bedeutend schwieriger ist, die Deuteroalbumose C zu entfernen. Die Beseitigung der ersteren Körper geht ganz einfach vor sich auf die Weise, daß man das Pepton mehrmals mittels 96-proz. Alkohol extrahiert, den Rest preßt und den Alkohol verdampft. Man dürfte somit stärkere Gifte erhalten durch die Verwendung eines Substrates mit alkoholextrahiertem Pepton; dieses gilt natürlicherweise nur von den Giften, auf welche die alkohollösliche Substanz als Antikörper wirkt.

Hier wird ein Versuch angeführt, wo Staphylokokken teils in Bouillon mit gewöhnlichem (2-proz.), teils in einer mit alkoholextrahiertem Pepton (2-proz.) gezüchtet sind. Proben sind nach verschiedenen Zeiträumen herausgenommen und auf gewöhnliche Weise gemessen (Kurve 3, p. 89).

Hier sieht man, daß die Lysinkurve der Kultur mit extrahierten Pepton bedeutend höher liegt als die Kurve des gewöhnlichen Pepton. Durch Beseitigung des Antilysins ist somit eine Produktion von ca. 50 Proz. Hämolyse über dem gewöhnlichen erreicht.

Es war im hiesigen Institute eine Zeitlang unmöglich, Lysine mit *Vibrio Nasik* und *Vibrio El Tor* mittelst der gewöhnlichen Peptonbouillon darzustellen, weshalb ich die Gelegenheit ergriff zu untersuchen, ob eine Extraktion des verwendeten Peptons durch Alkohol sich als nützlich zeigen würde. Kulturen wurden von den genannten Organismen hergestellt, teils in Bouillon mit gewöhnlichem Pepton, teils in Bouillon (dasselbe Präparat) mit extrahiertem Pepton. Nach Verlauf von 19 Tagen wurden die Kolben aus dem Thermostaten herausgenommen und die Hämolysinkonzentrationen untersucht. Es zeigte sich wiederum, daß die Hämolysinbildung in den Kulturen mit gewöhnlichem Pepton eine überaus geringe war, indem ca. 2 ccm aus den *Vibrio-Nasik*-Kulturen und ca. 1 ccm aus den *El Tor*-Kulturen notwendig waren, um totale Hämolyse zu erzielen; aus den entsprechenden Kulturen mit extrahiertem Pepton genügten beziehungsweise 0,007 ccm und 0,01 ccm

für die totale Hämolyse. Es gelang somit ein Nasik-Lysin darzustellen, welches ca. 286mal, und ein El Tor-Lysin, welches ca. 100mal stärker war als das durch gewöhnliches Pepton dargestellte. Es ist etwas schwer verständlich, daß die Beseitigung der alkohollöslichen Antikörper einzig und allein dieser kolossalen Vermehrung der Hämolysinmenge zu Grunde liegen sollte, weil sich früheren Untersuchungen zufolge nur verhältnismäßig kleine Mengen von dem vibriolysin-neutralisierenden Stoff finden.

Man ist gewöhnlich geneigt zu sagen, daß der betreffende Mikrobe seine toxigenen Eigenschaften verloren hat, wenn Schwierigkeiten bei der Toxindarstellung durch Bakterienrassen, welche sonst stark toxigen sind, eintreffen. Man hat ja indessen schon lange gewußt, daß die Zusammenstellung des Substrates, die Reaktion usw. nicht gleichgültig ist; diese Versuche zeigen ebenfalls, daß man zuweilen die Ursachen im Substrate, worin die Mikroben gezüchtet werden, suchen muß.

Um zu untersuchen, ob die Peptonfraktionen mit Prolysin-aktivierenden Eigenschaften auch fördernd auf die Lysinbildung in den Kulturen wirken könnten, wurden Versuche gemacht, mit Zucht von Staphylokokken in Bouillon, welchen 2 Proz. aus den verschiedenen Fraktionen hinzugesetzt waren. Die Kulturen wurden nach 8 Tagen (bei 37° C) gemessen und hatten das folgende Resultat gegeben (Tabelle IX).

Tabelle IX.

2 Proz. der Bouillon hinzugefügt	Lysineinheiten pro ccm Kultur
Pepton Witte	143
Deuteroalbumose A	1430
B	1000
Heteroalbumose	909
Protoalbumose	909
Pepton A	200

Es hat sich also gezeigt, daß Zusatz von primären Albumosen und Deuteroalbumen A und B ein sogar viel stärkeres Lysin erzeugte als das gewöhn-

liche „Pepton Witte“, während Pepton A dagegen den Hämolsininhalt nur verhältnismäßig wenig vermehrte.

Außerdem wurden Versuche mit Zucht von Tetanusbacillen, Staphylokokken, El Tor- und Nasik-Vibrionen gemacht; 2 Proz. von „Pepton Witte“ auf verschiedene Weisen behandelt, wurden der Bouillon hinzugefügt.

Bouillon I: 2 Proz. von „Pepton Witte“.

Bouillon II: 2 Proz. von „Pepton Witte“, mittelst Alkohol extrahiert.

Bouillon III: 2 Proz. von „Pepton Witte“, auf folgende Weise behandelt:

Das Pepton wird in Wasser gelöst und mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gesättigt, der Niederschlag wird abfiltriert, mit einer gesättigten Lösung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gewaschen und etwa trocken in Filtrierpapier gepreßt; Auflösung in Bouillon.

Inhalt: Alle primären und sekundären Albumosen mit Ausnahme von der Deuteroalbumose C.

Bouillon IV: 2 Proz. von „Pepton Witte“, auf dieselbe Weise wie in

Bouillon III behandelt, nur wurde das Pepton vor der Behandlung mittelst 96-proz. Alkohol extrahiert.

Bouillon V: 2 Proz. von „Pepton Witte“ auf folgende Weise behandelt:

Das Pepton wird in Wasser gelöst und mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gesättigt. Aus dem Filtrat wird außerdem die Deuteroalbumose C durch Zusatz von einer hinreichenden Menge  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gefällt. Die zwei Niederschläge werden gewaschen und gesammelt, trocken gepreßt und in der Bouillon gelöst.

Inhalt: Alle primären und sekundären Albumosen.

Die Substrate wurden auf gewöhnliche Weise schwach alkalisiert.

Die Staphylokokkenkulturen wurden nach Verlauf von 9 Tagen, die übrigen nach 16 Tagen untersucht. Temperatur  $37^\circ \text{C}$ . Die Resultate dieser Untersuchungen sind in der Tabelle X zusammengestellt.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß es nicht in allen Fällen wie vorausgesehen ergangen ist, in einzelnen Fällen sogar in entgegengesetzter Richtung, in den meisten aber, wie man es von vornherein erwarten konnte; man muß sich jedoch erinnern, daß natürlicherweise mehrere Faktoren außer dem hier herangezogenen Einfluß auf die Lysinbildung ausüben, und von diesen samt ihren Wirkungsarten wissen wir sehr wenig. Es scheint doch unstreitig zu sein, daß man durch Beseitigung der nachteiligen Körper des Substrates eine stärkere Lysinbildung erreicht hat, und aus diesem Grunde fordern diese vorläufigen Untersuchungen zu einer rationelleren Bearbeitung der Frage auf.

Tabelle X.

	Bouillon I	Bouillon II	Bouillon III	Bouillon IV	Bouillon V
	2 Proz. von „Pepton Witte“	2 Proz. von „Pepton Witte“ mit- telst Alkohol ex- trahiert	2 Proz. von „Pepton Witte“ auf folgende Weise behan- delt: Das Pepton wird in Wasser gelöst und mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> gesättigt; der Niederschlag wird abfil- triert, mit einer gesätt. Lösung von (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ge- waschen und etwas trocken in Filtrierpapier gepreßt; Auflösung in der Bouillon. Inhalt: Alle primäre und sekundäre Albumosen mit Ausnahme der Deutero- albumose C	2 Proz. von „Pepton Witte“ auf dieselbe Weise wie in Bouillon III behandelt nur wurde das Pepton vor der Behandlung mit- telst 96-proz. Al- kohol extrahiert	2 Proz. von „Pepton Witte“, auf folgende Weise behan- delt: Das Pepton wird in Wasser gelöst und mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> gesättigt. Aus dem Filtrat wird außerdem die Deuteroalbumose C durch Zusatz von einer hinreichend Menge H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> gefällt. Die zwei Nieder- schläge werden gewaschen und gesammelt, in Filtrir- papier trocken gepreßt und in der Bouillon gelöst. Inhalt: Alle primäre und sekundäre Albumosen.
Erwartete Aenderungen in der Häm- olysinbildung	Staphylo- Tetan- Nasik- El Tor- Lysin	stärkeres Lysin ” vielleicht etwas stärkeres Lysin vielleicht etwas stärkeres Lysin	stärkeres Lysin	stärkeres Lysin vielleicht etwas stärkeres Lysin vielleicht etwas stärkeres Lysin	vielleicht etwas stärkeres Lysin vielleicht etwas stärkeres Lysin
Beobachtete Aenderungen in der Häm- olysinbildung	1000 10 33 100	3703 33 100 100	2500 10 33 100	1000 33 33 17	1000 10 33 33

Die Ziffern geben Lysineinheiten pro Kubikzentimeter Kultur an.



### Zusammenfassung.

1) Durch Zusatz von „Pepton Witte“ oder „Pepton Chaptault“ zu einem hämolytischen Staphylokokkenfiltrat wird die hämolytische Wirkung bedeutend (bis mehrere Hundert Prozent) verstärkt.

2) Dergleichen Phänomene sind in Kulturen von *Bacillus tetani*, *Bacillus megatherium*, *Vibrio Nasik* und *Vibrio El Tor* nachgewiesen worden.

3) Entsprechende Verhältnisse sind bei der Untersuchung von Diphtherie- und Tetanuskulturen (Spasmin) konstatiert worden, wenn auch nicht in gleicher Ausdehnung wie bei den Hämolysinen.

4) Es läßt sich denken, daß die Hämolysinbildung in einer Kultur auf nachfolgende Weise vor sich geht: Die Mikroben scheiden einen Körper „Prolysin“, eine in physiologischer Beziehung unwirksame Substanz, aus, und dieser wird alsbald im Substrate durch die Peptonbestandteile zu Hämolysin „aktiviert“.

Die Hämolysinbildung hört auf, wenn die „aktivierende“ Substanz in der Kultur verbraucht ist, wogegen die Mikroben die „Prolysinbildung“ fortsetzen, weil das „Prolysin“ sich, nach Aktivierung durch weiteren Peptonzusatz, wie oben erwähnt, nachweisen läßt.

Das Hämolysin darf folglich als ein solcher Körper aufgefaßt werden, welcher durch Prozesse im Substrat außerhalb der Zelle entstanden ist.

5) Diese „Prolysine“ können nicht als Zymogene aufgefaßt werden, wie z. B. das Pepsinzymogen, weil sie sich nicht durch verdünnte Säuren aktivieren lassen.

6) Der „Aktivierungsprozeß“ an sich ist wahrscheinlich auch nicht von enzymartiger Natur, weil sowohl das „Prolysin“ (Staphyloprolysin) als auch die „aktivierende“ Substanz das Kochen ertragen.

7) Die Beobachtung, daß sich in Kulturen mit einem großen Peptonüberschuß dennoch aktivierbare „Prolysine“ finden, kann vielleicht auf die Weise erklärt werden, daß die

Mikroben die „Prolysinbildung“ fortsetzen, nachdem die „aktivierende“ Substanz im Substrate verbraucht ist.

8) Wenn Staphylokokken in Bouillon mit steigendem Peptoninhalt gezüchtet werden, nimmt die Hämolyisinbildung nur bis an eine gewisse Peptonkonzentration zu, und die größte Hämolyisinkonzentration wird bei 5-proz. Peptoninhalt erreicht. Bei größeren Peptonmengen wird die Hämolyisinbildung bedeutend schwächer, was wahrscheinlich durch das schlechte Wachstum in den konzentrierten Substraten verursacht wird.

In allen Kulturen fanden sich bedeutende Mengen von „Prolysin“, doch ebenfalls mit Maximum bei 5-proz. Peptoninhalt.

Daß in den Kulturen mit sehr großer Peptonkonzentration (10 und 20 Proz.) ziemlich große Prolysinmengen vorhanden sind, welche der großen Peptonkonzentration zum Trotz nicht „aktiviert“ worden sind, läßt sich nicht in Einklang mit den geschilderten Annahmen bringen.

9) Es läßt sich denken, daß das Hämolyisinmolekül aus mindestens zwei Komponenten gebildet wird, und zwar die Bakterienkomponente („Prolysin“) und die Peptonkomponente.

10) Die „Prolysine“ scheinen nicht als Antigene auftreten zu können.

11) Die „Prolysine“ vermögen nicht das dem betreffenden Lysin entsprechende Antilysin zu binden.

12) Das „Prolysin“ dialysiert schneller als das Lysin.

13) Durch fraktioniertes Aussalzen einer Staphylokokkenkultur mittels  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wird bei kleinen Salzmengen verhältnismäßig mehr Lysin als „Prolysin“ gefällt, und bei großen Salzmengen ist das Umgekehrte der Fall. Auf diese Weise ist es kaum möglich, Lysin und „Prolysin“ quantitativ voneinander zu trennen.

14) Durch fraktioniertes Aussalzen einer Staphylokokkenkultur (welche also sowohl „Prolysin“ als Lysin enthält) mittels  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  stellt es sich heraus, daß die Verteilung des Lysins und „Prolysins“ auf die verschiedenen Fraktionen prozentweise die folgende war:

	„Prolysin“ Proz.	Lysin Proz.
Primäre Albumosen	53	77
Deuteroalbumose A	35	19
Deuteroalbumose B	7	4

Dieses fällt mit der Beobachtung zusammen, daß das Lysinmolekül vorzugsweise durch Ammoniumsulfat ausgesalzen wird.

15) Bei Erwärmung folgen, wie es scheint, sowohl „Prolysin“ als Lysin denselben Gesetzen.

16) Die Lysinkomponente im „Pepton Witte“ erträgt das Kochen und das Gefrieren (jedenfalls bis  $\div 80^{\circ}$  C) und dialysiert verhältnismäßig leicht durch tierische Membranen und Pergamentpapier.

17) Durch fraktioniertes Aussalzen mittels Ammoniumsulfat wurde das „Pepton Witte“ in nachfolgende Fraktionen zerlegt: Heteroalbumose, Acroalbumose, Protalbumose, Deuteroalbumose A, B und C nebst Pepton A und B. Bei der quantitativen Vergleichung der aktivierenden Eigenschaften dieser Gruppen stellte es sich heraus, daß ihre Wirkung auf die verschiedenen Hämolysine nicht ganz dieselbe war.

Staphylo-Prolysin wird durch Heteroalbumose, Protalbumose, Deuteroalbumose A und B nebst Pepton A aktiviert, wogegen Deuteroalbumose C und Pepton B neutralisierend auf das Lysin wirkten.

Für das Tetano-Prolysin gilt dasselbe mit der Ausnahme, daß die Deuteroalbumose C sich indifferent zu verhalten scheint.

Das Vibrio (Nasik)-Prolysin verhält sich auf dieselbe Weise wie das Staphylo-Prolysin, doch scheinen die zwei Peptone indifferent zu sein.

Die Acroalbumose übt gar keine Wirkung auf die drei erwähnten Lysine aus.

18) Man kann sich denken, daß die Reaktion, welche sich bei der Umbildung des „Prolysins“ in Lysin ereignet, von solcher Art ist, daß mehrere Atome dem „Prolysinmolekül“ hinzugefügt werden, weil das Lysinmolekül, den oben erwähnten Untersuchungen zufolge, wahrscheinlich größer und kompli-

zierter ist als das „Prolysinmolekül“; vielleicht handelt es sich hier um einen Additionsprozeß.

19) Die alkohollösliche und Tetanolysin neutralisierende Substanz, welche Madsen und Walbum im „Pepton Witte“ gefunden haben, neutralisiert außerdem das Staphylolysin und übt auch eine schwache Wirkung auf das Vibriolysin (Nasik und El Tor) und Diphtherietoxin aus, während es ganz unwirksam gegenüber Megatheriolysin und Tetanospasmin ist. Dieser Körper ist vielleicht mit dem Pepton B identisch.

20) Außer diesem Antilysin ist im „Pepton Witte“ auch ein anderes mit gleichen Eigenschaften gefunden worden, und zwar die Deuteroalbumose C; diese wirkt stark neutralisierend auf Staphylolysin, schwächer auf Nasik-, El Tor-Lysin und Diphtherietoxin, wogegen sie keine Wirkung auf Tetanospasmin und Tetanolysin ausübt.

21) Durch Zucht von Staphylokokken in Bouillon, welche, um das alkohollösliche Antilysin zu beseitigen, mit alkohol-extrahiertem Pepton zubereitet ist, ist es möglich, eine bedeutend stärkere Lysinbildung (ca. 50 Proz.) zu erreichen, als in einer Bouillon mit nicht extrahiertem Pepton. Es gelang in einem auf diese Weise zusammengesetzten Substrate, ein Nasik-Lysin ca. 286mal und ein El Tor-Lysin ca. 100mal stärker darzustellen als in Bouillon mit nicht behandeltem Pepton.

22) Es stellte sich heraus, daß man durch Zucht von Staphylokokken in einer Bouillon, zu der statt gewöhnliches „Pepton Witte“ verschiedene „aktivierende“ Fraktionen aus demselben hinzugefügt wurden, eine 10mal stärkere Hämolysinbildung erreichen konnte als durch nicht behandeltes „Pepton Witte“.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.; Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. P. Ehrlich (Bakteriologisch-hygienische Abteilung: Prof. M. Neisser).]

### **Verwendung von Bakterien-Antiforminextrakten als Antigene bei der Komplementbindung.**

Von **K. Altmann und J. H. Schultz.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. Juni 1909.)

Das Prinzip, Bakterienextrakte als Antigene bei der Komplementbindung zu benutzen, ist bekanntlich von Wassermann und Bruck erkannt worden. Diese Modifikation hat gegenüber den ursprünglich von Bordet und Gengou für die Komplementbindung verwendeten Bakterienemulsionen wesentliche Vorteile, denen es zuzuschreiben ist, daß seit den grundlegenden Arbeiten jener Autoren die Komplementbindung auch auf bakteriologischem Gebiete eine brauchbare Laboratoriumsmethode geworden ist.

Ein Nachteil der Wassermannschen Extrakte ist der, daß ihre Herstellung mehrere Tage in Anspruch nimmt, was unter Umständen ihre Anwendbarkeit beeinträchtigen kann. So haben z. B. de Beche und Kon, die die Komplementbindungsmethode mit großem Erfolge zur Differenzierung der Choleravibrionen von den choleraähnlichen verwandten, im Interesse einer schnelleren Identifizierung verdächtiger Stämme auf die ursprüngliche Bordet-Gengousche Technik zurückgegriffen, da sich ja Bakterienemulsionen ohne Zeitaufwand herstellen lassen. Es wäre also von großer Wichtigkeit, wenn es gelänge, die Vorzüge wässriger Extrakte dadurch zu erhöhen, daß ihre Herstellung ohne Zeitverlust gelingt. Nun hat Uhlenhuth<sup>1)</sup> vor kurzem über ein neues Desinficiens,

---

1) Bericht über die 2. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin 1908. Centralbl. f. Bakt., Beilage zu Abt. I, Bd. 42, 1908, Referate.

das Antiformin, berichtet, das die Eigenschaft hat, die meisten Bakterienarten wasserklar aufzulösen, ohne ihre antigenen Eigenschaften zu zerstören. Es lag nahe, diese Bakterienauflösungen für die Komplementbindungsmethode nutzbar zu machen. Der eine von uns (Altmann) hat diesen Weg seit längerer Zeit beschritten, und seine Resultate, über die er an anderer Stelle ausführlich berichten wird, sind so ermutigend, daß wir es für angezeigt hielten, uns mit der Technik der Herstellung von Antiformin-Bakterienextrakten etwas systematischer zu befassen, und zwar zunächst von dem Gesichtspunkte aus, möglichst brauchbare Antigene für die Komplementbindungsmethode zu gewinnen. Zu diesen Untersuchungen dienten uns Typhusbacillen aus unserer Sammlung, die sich kulturell und serologisch völlig typisch verhalten.

Sollen Antiforminextrakte zu hämolytischen Versuchen verwandt werden, so müssen sie selbst ohne Einfluß auf das Testobjekt, die roten Blutkörperchen, sein; damit ist gesagt, daß wir das stark alkalische und chlorreiche Antiformin nach Lösung der Bakterien auf völlig neutrale Reaktion bringen und jede Spur freien Chlors entfernen müssen. Zur Neutralisierung bedienten wir uns zunächst nach Uhlenhuth 10-proz. Schwefelsäure (zur Abstumpfung des Alkali) und einer 10-proz. Natriumsulfitlösung (zur Entfernung des Chlors). Als Indikatoren dienten Lackmuspapier und Jodkalium-Stärkepapier; dieses färbt sich bei Anwesenheit von Chlor dunkelschwarzblau <sup>1)</sup>).

Es empfiehlt sich, dabei so vorzugehen, daß die zuerst vorzunehmende Abstumpfung der alkalischen Reaktion nicht völlig bis zum Neutralpunkt ausgeführt wird, da es sich zeigte, daß in diesem Falle nach der darauffolgenden Entfernung des Chlors der Extrakt leicht saure Reaktion annehmen kann. Man beginnt deshalb mit dem Zusatz von Natriumsulfit schon dann, wenn durch Lackmuspapier noch eine schwach alkalische Reaktion angezeigt wird. Selbstverständlich wird der dann

---

1) Auch wenn das Papier keine Chlorreaktion mehr zeigt, werden zweckmäßig noch 1—2 Tropfen Natriumsulfitlösung zugefügt.

ganz chlorfreie Extrakt schließlich auf völlig neutrale Reaktion gebracht.

Die Neutralisierung blieb im Prinzip stets die gleiche. Auf die nach unseren jetzigen Versuchen zweckmäßigste Dosierung werden wir abschließend nochmals zurückkommen.

Wir stellten nun zunächst fest, daß nach diesem Verfahren hergestellte 10-proz. Antiforminlösungen die Hämolyse durch ein wirksames System von Ambozeptor und Komplement in keiner Weise beeinflussen.

Erwies sich so das Antiformin an und für sich als brauchbar, so suchten wir zunächst die günstige Konzentration für die Extraktgewinnung festzustellen. Wir machten es uns zur Aufgabe, mit einer tunlichst niedrigen Antiforminkonzentration zu arbeiten, um möglichst wenig versuchsfremde Substanz (Neutralisierungssalze usw.) zu benutzen. Für Typhusbakterien, die auf Agar ein mäßig reichliches Wachstum zeigen, liegen die Verhältnisse so, daß man eine 24-stündige Schrägagarkultur in 10 ccm 2-proz. Antiformins völlig rein und restlos zur Lösung bringt (in Uebereinstimmung mit den Angaben von Uhlenhuth, l. c.). Bei niedrigeren Konzentrationen (1-proz.,  $\frac{1}{2}$ -proz.) bleiben in dem gleichen Volumen Flüssigkeit Bakterien ungelöst. Dies verhält sich makroskopisch dadurch, daß im Gegensatz zu dem absolut wasserklaren 2-proz. Extrakt in dem 1- und  $\frac{1}{2}$ -proz. feine schleimige Schlieren auftreten, denen im mikroskopischen Bilde strukturell erhaltene, mit Fuchsin färbbare Bakterien entsprechen. Bei Verdunstung gut gelöster Extrakte auf dem Objektträger restiert nur spärlich eine amorphe, teils fädige, teils klecksige sehr schlecht färbbare Masse. Höhere Konzentrationen lösen sich etwas schneller (4-, 5-, 10-proz.); ihr makroskopisches und mikroskopisches Verhalten unterscheidet sich von dem 2-proz. Extrakte nicht.

Die zur Lösung notwendige Zeit entspricht natürlich der Konzentration des Lösungsmittels und der Temperatur. Sie beträgt für die 2-proz. Typhusextrakte bei Zimmertemperatur etwa 30 Minuten; bei 37° ebensoviel, bei 40–50° 10–15 Minuten; bei 60–75° 3–10 Minuten; bei 80–100°  $\frac{3}{4}$ –2 Minuten.

Diese Vergleichswerte wurden stets so bestimmt, daß eine größere Anzahl Kulturen in so viel destilliertem Wasser abgeschwemmt wurde, daß einer Kultur 5 ccm entsprachen, und nun nach gründlichem Durchschütteln von diesem Gemische die entsprechenden Proben entnommen und mit gleichen Teilen Antiforminlösung von doppelter Konzentration versetzt wurden.

Die von uns in 10 ccm 2-proz. Antiformins gelöste Kulturmenge liegt der Grenze der Lösungsfähigkeit schon ziemlich nahe; während 1,10, 1,15, 1,20, 1,25 ccm Kultur noch restlos in Lösung gingen, traten von 1,3 Kulturmasse an schon Schlieren, von 1,5 an eine deutliche Opaleszenz und leichte gelbliche Verfärbung der Extrakte auf, die sich auch mit Hilfe höherer Temperaturen (60°, 75°, 80°, 100°) nicht zum Verschwinden bringen ließen, sondern sich im Gegenteil namentlich bei längerem (2 Stunden) Einwirken einer Temperatur von 100° verstärkten und vielfach zu flockigen Ausfällungen führten.

Dementsprechend ist natürlich auch das Alter und die Stärke des Wachstums der Ausgangskulturen von entscheidendem Einflusse; wir gingen deshalb bei Herstellung unserer Ausgangskulturen stets so vor, daß wir von einer Bouillonkultur bestimmten Alters unter Verwendung derselben Oese die Versuchsaagarröhrchen möglichst gleichmäßig verteilend beimpften.

Um den Einfluß der Temperatur auf die Eigenschaften der Extrakte festzustellen, lösten wir gleich angesetzte Extrakte bei Zimmertemperatur, 37, 40, 45, 50, 60, 75, 80 und 100°. Neben den schon erwähnten Unterschieden der Lösungszeit ergaben sich dabei typische Unterschiede im chemischen Verhalten; nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten sind die Extrakte bei Temperaturen über 60° chlorfrei; bei 50° sind hierzu 45 Minuten erforderlich, von 75° aufwärts genügen wenige (3—5) Minuten, ohne daß dabei die Lösung irgendwie gestört wird. Bei Temperaturen von Zimmertemperatur an bis 40° angesetzte Extrakte sind erst nach mehrstündigem (mindestens 4-stündigem) Stehen chlorfrei. Die Alkaleszenz wird weniger intensiv durch Temperaturerhöhung beeinflusst.



Ihre Schwankungen sind sehr eigentümliche, wie z. B. die Neutralisierungstabelle der folgenden 5 identisch angesetzten Extrakte (eine Kultur in 10 ccm 2-proz. Antiformins) zeigt:

Tabelle I.

Extrakt		braucht zur Neutralisierung	
Temp.	Zeit	5-proz. Schwefelsäure	5-proz. Natriumsulfitlösung
100°	30 Min.	0,15	0
100°	5 "	0,12	0
75°	30 "	0,15	0
75°	5 "	0,12	0
40°	30 "	0,20	0,20

Aus dem Vorhergehenden ergibt sich auch der Zeitpunkt der Neutralisierung; Extrakte, die mit Temperaturen bis zu 45° angesetzt sind, kann man nach etwa 45 Minuten neutralisieren. Längere Lösungszeiten wirken bei diesen Temperaturen verstärkend, so daß 24 Stunden lang gelöste Extrakte oft etwas wirksamer sind; allerdings handelt es sich hier nur um sehr geringe Unterschiede. Bei höheren Temperaturen (75—100°) gelöste Extrakte können schon nach 3—5 Minuten neutralisiert werden. Längeres Einwirken dieser hohen Temperaturen ist nicht günstig.

Die Prüfung der so gewonnenen Extrakte geschah nach drei Richtungen; es wurde untersucht 1) auf Eigenhämolyse, 2) auf Eigenhemmung, 3) die kleinste nachweisliche Menge.

Die Prüfung auf Eigenhämolyse geschah so, daß fallende Mengen unverdünnten Extraktes, der durch Kochsalzzusatz blutisotonisch gemacht war, mit gleichen Teilen einer 5-proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung versetzt und 2 Stunden bei 37° gelassen wurden. Eigenhämolyse wurde nie beobachtet.

Die Prüfung auf Eigenhemmung geschah so, daß fallende Extraktmengen mit gleichen Mengen Meerschweinchenkomplements eine Stunde bei 37° digeriert wurden; dann erfolgte Zusatz von Ambozeptor und Blut. Dabei zeigte sich, daß die Eigenhemmung der Antiforminextrakte außerordentlich gering, also die Reaktionsbreite, d. h. die Differenz von

noch zur Komplementbindungsreaktion ausreichender und an sich hemmender Dosis sehr bedeutend ist, so daß auch hierin die Antiforminextrakte den wässerigen Schüttelextrakten überlegen sind. Ueber vergleichende Spezifitätsversuche wird an anderer Stelle berichtet werden.

Was die Technik der Komplementbindung anbelangt, so bedienten wir uns zunächst des bei hämolytischen Versuchen üblichen Verfahrens; es wurden gleiche Mengen täglich frischen aktiven Meerschweinchenserums mit gleichen Mengen eines wirksamen spezifischen Immunserums (inaktiv) und fallende Mengen der zu prüfenden Extrakte eine Stunde bei 37° digeriert, dann erfolgte Zusatz von Blut und der jeden Tag im Vorversuch festgestellten doppelt lösenden Dosis des hämolytischen Ambozeptors. Das bakterielle Immunserum wurde von einem intravenös mit bei 60° abgetöteten Typhusbacillen behandelten Kaninchen gewonnen. Als hämolytischer Ambozeptor diente das inaktive Serum eines mit gewaschenen Hammelerythrocyten intraperitoneal injizierten Kaninchens. Wir arbeiteten mit einem Gesamtvolumen von 1,3 ccm (fallende Mengen Extrakt, auf 0,5 ccm mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt, 0,1 ccm des halbverdünnten Meerschweinchenserums, je 0,1 ccm des entsprechend verdünnten bakteriellen und hämolytischen Immunserums und 0,5 ccm einer 5-proz. Hammelerythrocytenaufschwemmung).

Diese Methode hat den Vorzug großer Handlichkeit. Für die einfache Feststellung, ob ein Extrakt wirksam ist oder nicht, ist sie völlig ausreichend, auch läßt sie, entsprechend der relativ hohen Komplementkonzentration, die man der täglichen Schwankungen wegen wählen muß, geringe Hemmungen zurücktreten. Mit diesem System geprüft, lenkten unsere Extrakte durchschnittlich noch in Verdünnungen von 1:250 bis 1:500 ab, ohne daß sie unverdünnt selbst in Mengen von 0,3—0,5 eine Spur von Eigenhemmung zeigten.

Dagegen schien es uns für die Austitrierung der geringsten noch nachweislichen Extraktmenge von Vorteil, mit einem empfindlicheren System zu arbeiten.

Da es naturgemäß für die Feinheit der Methode von wesentlicher Bedeutung ist, einen Ueberschuß von Kom-

plement zu vermeiden, worauf besonders Sachs<sup>1)</sup> hingewiesen hat, so arbeiteten wir im Vorversuch nicht mit gleichen Mengen Meerschweinchenserum, sondern versetzten die in früheren Versuchen festgestellte wirksame Dosis des hämolytischen Ambozeptors mit fallenden Mengen Meerschweinchenserum und stellten so die zur kompletten Hämolyse erforderliche geringste Quantität Komplement fest. Diese Menge ließ sich auch dadurch weiter reduzieren, daß eine kleinere Blutmenge verwendet wurde (statt 0,5 0,1 ccm im selben Gesamtvolumen). Ähnliche Versuche von anderen Gesichtspunkten aus liegen unter anderen von Moro<sup>2)</sup> vor. Da ferner in dem von uns als Antikörper verwendeten Typhus-Kaninchenserum normale Ambozeptoren für Hammelblut vorhanden sind, die verstärkend auf die Hämolyse einwirken würden, und wir stets in unseren Versuchen mit der gleichen Menge bakteriellen Immunserums arbeiteten, wurde im Vorversuch bei der Einstellung des Komplementes diese hämolytische Quote dadurch mitberücksichtigt, daß bei der Einstellung neben dem hämolytischen Immunambozeptor auch das (den Normalambozeptor enthaltende) bakterielle Immunserum in der im Hauptversuch zu verwendenden Menge hinzugefügt wurde. Der Grund, warum wir, um diesen komplizierenden Faktor auszuschalten, zu unseren Versuchen nicht Ochsenblut nahmen, für das Kaninchenserum keinen Normalambozeptor besitzt, war der, daß wir die hemmende Wirkung eines Serums, das keine Normalambozeptoren für die im Versuch verwandte Blutart enthält — Verhältnisse, auf die Sachs hingewiesen hat — vermeiden wollten. Vorwegnehmen möchten wir noch Versuche, die deutlich illustrieren, wie wesentlich für den Nachweis minimalster Antigenmengen eine genaue Einstellung des Komplementes ist. In Tabelle II ist ein Versuch dargestellt, in dem die in Kolumne e verwandte Komplementmenge durch den

---

1) H. Sachs, Hämolsine und Cytotoxine des Blutserums. Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung von Kraus-Levaditi.

2) Moro, Klinische Alexinprobe. Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 21, p. 1026.

Vorversuch als kleinste komplett lösende Dosis festgestellt ist. Diese ermöglicht noch den Nachweis von  $\frac{1}{6250}$  des Bakterienextraktes. Steigen wir nur um ein geringes mit der Komplementmenge, so nimmt die Feinheit der Reaktion, wie aus Kolumne a, b und c ersichtlich, sogleich ab.

Tabelle II.

Extrakt	Bakterielles Immunserum inaktiv	Hämolytischer Ambozeptor	Lösung von 0,1 ccm 5-proz. Hammelblutes bei Anwendung von Meerschweinchenserum				
			a	b	c	d	e
			0,05	0,04	0,03	0,02	0,015
0,004	0,005	0,00005	Spürchen	0	0	0	0
0,0008	0,005	0,00005	komplett	komplett	fast	Spur	0
0,00016	0,005	0,00005	„	„	komplett	mäßig	Spur
—	0,005	0,00005	„	„	„	komplett	komplett
0,008	—	0,00005	„	„	„	„	„
—	0,01	0,00005	„	„	„	„	„

Indem wir unsere Extrakte in dieser Weise prüften, kamen wir zu folgenden Ergebnissen: die in der beschriebenen Weise hergestellten Extrakte enthalten sämtlich wirksames Antigen, das nur in Verbindung mit dem homologen Antikörper i. e. Typhusimmunserum Komplementbindung gibt, dagegen bei Verwendung nicht homologer Antikörper, z. B. Coli-Immunserum, die Hämolysen in keiner Weise beeinflußt.

Am leistungsfähigsten sind Extrakte, die bei  $40^{\circ}$ — $50^{\circ}$  30 Minuten lang oder bei  $75^{\circ}$ — $100^{\circ}$  5 Minuten lang belassen wurden. Da es sich zeigte, daß die Extrakte nach einiger Zeit schimmelten, wurde zur Konservierung 0,5-proz. Phenol zugesetzt, wodurch, wie daraufhin gerichtete Versuche zeigten, ihr sonstiges Verhalten in keiner Weise beeinflußt wurde.

Die geringste nachweisliche Menge beträgt  $\frac{1}{625} \times 0,10 = \frac{1}{6250}$  Extrakt. Um eine gewisse, wenn auch nur sehr annähernde Vorstellung von der Größenordnung dieser Quantität zu erhalten, können wir folgende schematische Ueberlegung ausführen:

$$1 \text{ Kultur} = 12 \text{ Oesen}$$

$$1 \text{ Oese} = 0,002 \text{ g}$$

$$1 \text{ Kultur} = \text{ca. } 0,025 \text{ g}$$

ferner:

$$1 \text{ Kultur} = 10 \text{ ccm Extrakt}$$

$$\frac{1}{10} \text{ Kultur} = 1 \text{ ccm Extrakt.}$$

Die geringste nachweisliche Menge beträgt ca.  $\frac{1}{6000}$  Extrakt, d. h.  $\frac{1}{60000}$  Kultur, oder in Gramm umgerechnet,

$$0,025 \text{ g} : 60000 = 0,0000004 \text{ g.}$$

Wir sind damit bei Verdünnungen angelangt, die den mit der Ablenkung nachweislichen Mengen von löslichem Eiweiß nahekommen. Diese Feststellung ist im Hinblick auf den von Wassermann und Bruck inaugurierten Antigennachweis im strömenden Blute bei Infektionskrankheiten zu klinisch-diagnostischen Zwecken von Bedeutung.

Es war nun noch von Interesse, einen Vergleich der Antiforminextrakte mit quantitativ gleich angesetzten wässrigen Schüttelextrakten anzustellen. Hierzu wurde eine Kultur in 10 ccm destillierten Wassers aufgeschwemmt und in der typischen Weise verarbeitet. Es zeigte sich, daß dieser Extrakt seiner starken Eigenhemmung wegen in unseren labilen Prüfungssystemen nicht verwendbar war; dabei blieb die erzielte Ablenkung hinter der des Antiforminextraktes erheblich zurück.

Andere Typhusstämmen verhielten sich hinsichtlich der Löslichkeit ebenso wie die von uns genauer untersuchten, mit Ausnahme eines einzigen, der durch sein auffallend üppiges Wachstum auf Agar charakterisiert ist und deshalb etwas mehr Antiformin zur Lösung beanspruchte.

Endlich ist eine Erfahrung noch erwähnenswert. Bei unseren Versuchen über die Wirksamkeit verschiedener Extrakte, die in der gleichen Menge gleich konzentrierten Antiformins verschiedene Mengen Kultur enthielten, zeigte sich ein weitgehender Parallelismus zwischen der Menge gelöster Kultur und der Stärke der Reaktion, so daß die noch nachweisbaren Substanzmengen im wesentlichen die gleichen waren; z. B.

war von zwei Extrakten, von denen der eine  $\frac{1}{4}$ , der andere  $\frac{10}{4}$  Kultur enthielt, der erste noch in einer Verdünnung von 1:500, der zweite in einer Verdünnung von ca. 1:5000 wirksam. Es läßt dies Resultat daran denken — worauf schon Uhlenhuth hingewiesen hat — mit Hilfe von Antiforminextrakten, deren biologische Prüfung vermittle der Komplementablenkung leicht und quantitativ gelingt, geaichte Lösungen wirksamer Bakteriensubstanz, z. B. zu immunisatorischen Versuchen (Bakteriotherapie usw.), zu gewinnen.

### Zusammenfassung.

Es gelingt mit Antiformin, Lösungen von Bakterien herzustellen, die sich als Antigen bei der Komplementbindung verwenden lassen. Für Typhusbacillen von typischem Wachstum benötigt eine 24-stündige Agarkultur 10 ccm 2-proz. Antiformins zur völligen Lösung, die am vorteilhaftesten in 30 Minuten bei 40—50° oder in 5 Minuten bei 75 bis 100° geschieht. Zur Neutralisierung dient 5-proz. Schwefelsäure. Die bei hohen Temperaturen hergestellten Extrakte (75—100°) sind bereits chlorfrei; aus den bei niedrigeren Temperaturen (40—50°) dargestellten Extrakten wird das Chlor durch 5-proz. Natriumsulfit entfernt. Als Indikator dienen Lackmus- und Jodkalium-Stärkepapier.

Mit so hergestellten Extrakten gelingt der Nachweis von  $\frac{1}{60000}$  Kultur, was ungefähr 0,0000004 g Bakteriensubstanz entspricht.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M.; Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. P. Ehrlich.]

### **Ueber die Empfindlichkeit von Krebsmäusen gegen intraperitoneale Tumorinjektionen.**

Von Prof. Dr. H. Apolant.

(Eingegangen bei der Redaktion am 21. Juni 1909.)

Vor kurzem berichtete Yamanouchi<sup>1)</sup> über einige Versuche an Tumormäusen, nach denen eine ausgesprochene Ueberempfindlichkeit geschwulsttragender Tiere gegen eine intraperitoneale Injektion des gleichen Tumormaterials besteht. Diese sich häufig schon nach 24 Stunden in Sträuben der Haare, Lähmung und frühzeitigem Tod dokumentierende Ueberempfindlichkeit tritt nach Yamanouchi nur bei Tieren auf, die Träger einer, wenn auch nur kleinen Geschwulst sind. Sie fehlt dagegen bei den erfolglos vorgeimpften Tieren (den Ehrlichschen „Nullern“), woraus der Autor schließt, daß es sich nicht um eine gewöhnliche Anaphylaxie handeln kann. Die Reaktion soll aber ferner streng spezifisch insofern sein, als sie bei Nachimpfung bei einem anderen Tumorstamm ausbleibt. So zeigten Tiere, die mit einem Michaelisschen Carcinom erfolgreich vorgeimpft waren, keine Erscheinungen auf Nachimpfung mit einem Ehrlichschen Carcinom.

Eine Nachprüfung dieser interessanten Angaben schien um so gebotener, als jüngst auch v. Dungern bei der Nachimpfung der mit seinem Hasentumor vorgeimpften Kaninchen eine Ueberempfindlichkeit gegen denselben Tumor beschrieben hat, die allerdings nur lokal ist, von ihm aber als Ursache der hier zu beobachtenden Immunität angesehen wird.

Ich stellte 4 Versuchsreihen an mit intraperitonealer Injektion einer Emulsion der Carcinome 11, 144 und 5, sowie des Sarkoms 16. In den beiden ersten Reihen erfolgte die Injektion zweimal in 24-stündigem Abstand, in den beiden






---

1) Compt. rend. Soc. biol., 1909, No. 16.

letzten nur einmal. Die Tiere waren teils Träger verschieden großer Tumoren des gleichen oder eines anderen Geschwulststammes, teils waren sie mit dem gleichen Stamm erfolglos vorgeimpft. Als weitere Kontrollen dienten normale Mäuse. Die Beobachtung erstreckte sich über eine Woche. Alle Einzelheiten sind aus den folgenden Tabellen ersichtlich.

Tabelle I.

Allen Tieren wurde am 3. Juni und am 4. Juni je 1,0 ccm Kochsalz-emulsion von Carcinom 11 intraperitoneal injiziert<sup>1)</sup>.








	Vor- behandlung	Größe d. Tumors am Tage der ersten Injektion (4mal verkleinert)	4. Juni	5. Juni	7. Juni	10. Juni
1.	geimpft mit Carcinom 11 am 7. Mai		gesund	gesund	gesund	gesund
2.	dgl.		"	"	"	"
3.	"		"	"	"	"
4.	"		"	"	"	"
5.	"	0	"	"	"	"
6.	"	0	"	"	"	"
7.	"	0	"	"	"	"
8.	"	0	"	"	"	"
9.	geimpft mit Carcinom 5 am 3. Mai		"	"	"	"
10.	normale Kontrolle		"	"	"	"
11.	"	"	"	"	"	"

1) Die Herstellung der Emulsion geschah in der Weise, daß ein haselnuß- bis kirschgroßer Tumor zu Brei zerstampft, mit ca. 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung zerrührt und durch feinstes Drahtsieb filtriert wurde.



Tabelle II.







Allen Tieren wurde am 3. Juni und am 4. Juni je 1,0 Kochsalz-emulsion von Carcinom 144 intraperitoneal injiziert.

	Vor- behandlung	Größe d. Tumors am Tage der ersten Injektion (4mal verkleinert)	4. Juni	5. Juni	7. Juni	10. Juni
1.	geimpft mit Carcinom 144 am 3. Mai		gesund	gesund	gesund	gesund
2.	dgl.		"	"	"	"
3.	"		"	"	"	"
4.	"		"	"	"	"
5.	"	0	Krämpf. †			
6.	"	0	gesund	"	"	"
7.	"	0	"	"	"	"
8.	"	0	"	"	"	"
9.	geimpft mit Carcinom 5 am 11. Mai		"	etwas matt	†	
10.	dgl.		"	gesund	gesund	"
11.	"		"	"	"	"
12.	normale Kontrolle		"	"	"	"
13.	"	"	"	"	"	"
14.	"	"	"	"	"	"

Aus den Tabellen I—IV ergibt sich als Gesamtergebnis, daß wir in keinem einzigen Falle eine Ueberempfindlichkeit tumortragender Tiere gegen die intraperitoneale Injektion einer Geschwulstemulsion desselben Stammes konstatieren konnten. In Tabelle I zeigt überhaupt kein Tier innerhalb 8 Tagen

Tabelle III.












Allen Tieren wurde am 4. Juni 1,0 Kochsalzemulsion von Carcinom 5 intraperitoneal injiziert.

	Vor- behandlung	Größe d. Tumors am Tage der Injektion (4mal verkleinert)	5. Juni	6. Juni	8. Juni	11. Juni
1.	geimpft mit Carcinom 5 am 30. April		gesund	gesund	gesund	gesund
2.	dgl.		"	"	"	"
3.	"		"	"	"	"
4.	"		"	"	"	"
5.	"		"	"	"	"
6.	"		"	"	"	"
7.	normale Kontrolle		"	etwas Diarrhöe	†	
8.	"	"	"	gesund	gesund	"
9.	"	"	"	"	"	"
10.	"	"	"	"	"	"
11.	"	"	"	"	"	"
12.	"	"	"	"	"	"

trotz zweimaliger Injektion irgendwelche krankhaften Erscheinungen. In Tabelle II betreffen die beiden beobachteten Todesfälle eine mit einem andern Tumor vorgeimpfte sowie eine Nullermaus. In Tabelle III starb nur eine normale Kontrolle innerhalb der Beobachtungszeit. Nur in Tabelle IV wurden unter 8 mit dem gleichen Sarkomstamm geimpften Tumortieren 3 Todesfälle konstatiert; dieselben können jedoch nicht im Sinne Yamanouchis gedeutet werden, denn der Tod trat hier erst 7 Tage nach der intraperitonealen Injektion

Tabelle IV.

Allen Tieren wurde am 7. Juni 1,0 Kochsalzemulsion von Sarkom 16 intraperitoneal injiziert.

	Vor- behandlung	Größe d. Tumors am Tage der Injektion (4mal verkleinert)	8. Juni	10. Juni	12. Juni	14. Juni
1.	geimpft mit Sarkom 16 am 8. Mai		gesund	gesund	gesund	†
2.	dgl.		"	"	"	gesund
3.	"		"	"	"	"
4.	"		"	"	"	"
5.	"	 ulce- riert	"	†	"	"
6.	"		"	gesund	"	"
7.	"		"	"	"	"
8.	"		"	"	"	†
9.	geimpft mit Carcinom 148 am 21. April		"	"	"	gesund
10.	dgl.		"	"	"	"
11.	"		"	"	"	"
12.	normale Kontrollen		"	"	"	"
13.	"	"	"	"	"	"
14.	"	"	"	"	"	"
15.	"	"	"	"	"	"
16.	"	"	"	"	"	"
17.	"	"	"	"	"	"
18.	"	"	"	"	"	"
19.	"	"	"	"	"	"
20.	"	"	"	"	"	"

und 5½ Wochen nach der Tumorimpfung ein, also zu einer Zeit, in der die Tiere infolge der beträchtlichen Geschwulst auch sonst zu sterben pflegen. Der Tod des 3 Tage nach der Injektion gestorbenen Tieres kann um so weniger auf Ueberempfindlichkeit bezogen werden, als der hier bestehende Tumor bereits längere Zeit ulzeriert war, und daher die Annahme einer sekundären Infektion als Todesursache wesentlich näherliegt.

Es fragt sich, wie die offenkundige Differenz zwischen meinen und Yamanouchis Befunden zu erklären ist. Daß die Reaktion von der Art des Tumors als solcher abhängig sein soll, ist wenig wahrscheinlich. Vielleicht spielt — was ich allerdings nur hypothetisch aussprechen kann — ein anderer Faktor eine Rolle, der sich beim Lesen der Yamanouchischen Arbeit aufdrängt. Es ist nämlich höchst auffallend, daß die Tumoren, mit denen der Autor arbeitete, außerordentlich schlecht wuchsen. Er erzielte in 1—2 Monaten nur 3—7 mm große Geschwülste, und gibt selbst an, daß er durch das schlechte Angehen der Impfungen auf französischen Tieren an der Fortsetzung seiner Versuche gehindert war. Nun wissen wir zwar aus den vielfach bestätigten Beobachtungen Michaelis', Bashfords und anderer, daß die Tumorübertragung auf fremdländische Rassen unter Umständen Schwierigkeiten bereitet. Nach einiger Zeit pflegen aber diese Schwierigkeiten, wenn der Tumor überhaupt übertragbar ist, geschwunden zu sein, so daß nun die Geschwulst in der fremden Tierrasse genau so wächst wie in der alten. Da wir aber annehmen dürfen, daß der von Yamanouchi benutzte Ehrlichsche Tumor schon längere Zeit in französischen Tieren gezüchtet wird, so erscheint es uns sehr unwahrscheinlich, das schlechte Wachstum jetzt noch mit der fremden Rasse zu erklären. Es besteht vielmehr die Vermutung, daß der Stamm im Laufe der Zeit infiziert wurde, und daß die Infektion die Ursache für die Abnahme der Proliferationsenergie bildet, was für andere Tumoren schon von Loeb vor Jahren konstatiert wurde. Ist diese Annahme berechtigt, so liegt der Gedanke nahe, daß es sich bei dem von Yamanouchi beobachteten Phänomen nicht um eine Tumor-, sondern um eine Bakterien-

überempfindlichkeit handelt. Es ist das, wie gesagt, nur eine Vermutung von uns. Jedenfalls müssen wir nach unsern Versuchen eine Ueberempfindlichkeit tumortragender Mäuse gegen ihren eigenen Tumor als prinzipielle Erscheinung in Abrede stellen.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem sero-bakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin.]

### **Ueber die Beziehungen der Immnhämolysine zu den Lipoiden.**

Von Dr. Kurt Meyer.

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. Juni 1909.)

Wie in der gesamten Biologie, so haben auch in der Immunitätslehre die Lipoide in neuerer Zeit vermehrte Bedeutung gewonnen. In seiner Monographie „Biochemie der Zelllipide“ gibt Bang<sup>1)</sup> einen anschaulichen Ueberblick über die hierher gehörigen Tatsachen. Besonders bei den hämolytischen Vorgängen spielen die Lipoide, aktiv und passiv, eine wichtige Rolle. Besteht doch die Blutkörperchenmembran zum größten Teile aus Lipoiden, womit bei dem gegenseitigen Lösungsvermögen der Lipoide auch ihre aktive Rolle als Blutgifte gegeben ist. Von diesen Gesichtspunkten ausgehend, prüfte ich<sup>2)</sup> vor einiger Zeit die Frage, ob auch die Immnhämolysine zu den Lipoiden gehören, indem ich sie auf ihre Lösungsfähigkeit in den gewöhnlichen Fettlösungsmitteln untersuchte. Ich extrahierte ein im Vakuum eingetrocknetes und staubfein zerriebenes Hammelblut-Kaninchenimmunserum mit Aether, Aceton, Chloroform und Benzol und untersuchte die extrahierten Pulver auf ihre hämolytische Wirksamkeit.

---

1) J. Bang, Asher-Spiro, Ergebnisse der Physiologie, Bd. 8, 1909, p. 463.

2) Kurt Meyer, Archiv f. Hygiene, Bd. 67. 1908, p. 118.

Soweit nicht ein Verlust durch Unlöslichwerden eingetreten war, wie bei Verwendung von Benzol und Aceton, war die Wirksamkeit unverändert geblieben. Dementsprechend erwiesen sich auch die Extrakte als wirkungslos. Auf Grund dieser Versuche hielt ich mich für berechtigt, die Lipoidnatur der hämolytischen Immunkörper auszuschließen.

Vor kurzem hat nun v. Eisler<sup>1)</sup>, ohne sich allerdings mit meinen Versuchen auseinanderzusetzen, eine widersprechende Auffassung vertreten. Ihm schien die rasche Aufnahme des hämolytischen Ambozeptors durch die Blutkörperchen für seine Lipoidlöslichkeit zu sprechen. Bei den engen Beziehungen, die zwischen Löslichkeit in Lipoiden einerseits und in Lipoidlösungsmitteln andererseits bestehen, suchte er die Frage durch 10 Minuten langes Ausschütteln des stark verdünnten hämolytischen Serums mit Aether zu entscheiden. Er fand bei diesem Versuche eine bedeutende Herabsetzung der hämolytischen Wirksamkeit des Serums. Die Wirkung des Ambozeptors durch Hinzufügen des Aetherextraktes zu restituieren, gelang nicht. v. Eisler schließt aus diesem Versuche nicht ohne weiteres auf die Lipoidnatur des Ambozeptors, sieht aber in ihm einen Anhaltspunkt für die Lipoidlöslichkeit des Immunkörpers.

Unter diesen Umständen schien mir eine nochmalige Prüfung der Frage geboten. Um mich der Versuchsanordnung v. Eislers möglichst zu nähern, nahm ich die Extraktion mit den Fettlösungsmitteln diesmal an einem flüssigen Hammelblut-Kaninchenimmunserum vor, das, um Emulsionsbildung möglichst hintanzuhalten, mit Kochsalzlösung auf das fünffache verdünnt war. Je eine Quantität Serum wurde im Gadamer-schen Extraktionsapparat 6 Stunden lang mit Aether und Petroläther extrahiert. Beim Benzol nahm ich, um Schädigungen durch Temperatureinflüsse zu vermeiden, von der Extraktion im Extraktionsapparat Abstand und schüttelte statt dessen das verdünnte Serum mit der gleichen Menge Benzol während 6 Stunden im Schüttelapparat. Die entstandene Emulsion wurde bis zur vollkommenen Scheidung zentrifugiert. Der

1) M. v. Eisler, diese Zeitschr., Bd. 2, 1909, p. 159.

Titer der Serumproben wurde in der üblichen Weise unter Verwendung von 1 ccm 5 Proz. Blutaufschwemmung mit 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

Serummenge	Unbehandeltes Serum	Mit Aether extrahiert	Mit Petroläther extrahiert	Mit Benzol geschüttelt
0,001 ccm	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.
0,0005 "	k. H.	k. H.	k. H.	k. H.
0,0002 "	i. H.	i. H.	i. H.	i. H.
0,0001 "	Spur	Spur	Spur	Spur

k. H. = komplette Hämolyse, i. H. = inkomplette Hämolyse.

Keines der Extraktionsmittel hatte also eine Verminderung der hämolytischen Wirksamkeit des Serums herbeigeführt. Auch nach diesen Versuchen ist demnach die Lipoidnatur der hämolytischen Immunkörper auszuschließen. Das widersprechende Ergebnis v. Eislers vermag ich nicht zu erklären.

War nach diesem Verhalten gegenüber den Lipoidlösungsmitteln auch die Lipoidlöslichkeit des hämolytischen Ambozeptors sehr unwahrscheinlich, so erschienen mir doch eigens hierauf gerichtete Versuche angebracht.

Auch hier boten Ausschüttelungsversuche den bequemsten Weg. Das aufs Fünffache verdünnte Serum wurde 6 Stunden lang mit der gleichen Menge neutralen Olivenöls ausgeschüttelt.

Ferner war es wünschenswert, die Affinität zu einem echten Lipoid zu bestimmen; Lecithin kam als Hauptbestandteil der Blutkörperchenmembran in erster Linie in Betracht. Da es an sich mit Wasser eine untrennbare Suspension gibt, so benutzte ich eine 5-proz. Lösung von Lecithin Merck in Chloroform, die ich zu gleichen Teilen mit dem Serum ebenfalls 6 Stunden hindurch auf der Maschine schüttelte. Die Prüfung der Sera geschah wie bei dem früheren Versuche (Tabelle II).

Tabelle II.

Serummenge	Unbehandeltes Serum	Mit Olivenöl geschüttelt	Mit Lecithin-Chloroform geschüttelt
0,001 ccm	k. H.	k. H.	k. H.
0,0005 „	k. H.	k. H.	k. H.
0,0002 „	i. H.	i. H.	i. H.
0,0001 „	Spur	Spur	Spur

Auch hier war, wie die Tabelle zeigt, das hämolytische Vermögen des Serums unverändert geblieben. Für eine allgemeine Lipoidlöslichkeit der hämolytischen Immunkörper liegen also ebenfalls keine Anhaltspunkte vor.

Dieses Ergebnis war wohl von vornherein zu erwarten. Denn wären die Immunkörper allgemein lipoidlöslich, so bliebe die Spezifität ihrer Bindung unverständlich. Gerade die Spezifität der Immunitätsvorgänge ist es ja, die immer wieder aller ein physikalischen Erklärungsversuche scheitern läßt und auf bestimmte chemische Konfigurationen hinweist.

Nicht berührt wird von unseren Versuchen die Frage, ob der Bestandteil des Blutkörperchens, an den der Immunkörper gebunden wird, ein Lipoid ist. Die Versuche von Bang und Forssman<sup>1)</sup> sowie von Dautwitz und Landsteiner<sup>2)</sup> scheinen ja in diesem Sinne zu sprechen, lassen aber noch vieles ungeklärt. Bang und Forssman stellten eine Neutralisationswirkung der acetonlöslichen Blutkörperchenlipoiden gegenüber hämolytischem Serum fest; auffallenderweise war aber diese trotz ihrer Spezifität gegen das Komplement gerichtet. Andererseits fanden Dautwitz und Landsteiner die acetonunlöslichen Lipoiden nur gegen die Normalambozeptoren, nicht gegen die Immunhämolysine wirksam. Bevor diese Befunde zur Deutung der bei der Hämolysen erfolgenden Bindungsvorgänge herangezogen werden können, bedürfen sie noch weitgehender Ergänzung.

1) Bang und Forssman, Hofmeisters Beiträge, Bd. 8, 1906, p. 238.

2) Dautwitz und Landsteiner, Hofmeisters Beiträge, Bd. 9, 1907, p. 431.



Auch hier führen vielleicht Ausschüttelungsversuche zu besser verwertbaren Ergebnissen als die vieldeutigen Neutralisationsversuche.

#### Zusammenfassung.

Es wird von neuem gezeigt, daß die hämolytischen Immunkörper in Fettlösungsmitteln (Aether, Petroläther, Benzol, Chloroform) unlöslich sind. Ihre Lipoidnatur ist daher auszuschließen.

Ferner wird nachgewiesen, daß die hämolytischen Immunkörper mit Olivenöl und Lecithin-Chloroform aus ihrer wässerigen Lösung nicht ausgeschüttelt werden können, daß sie also auch lipoidunlöslich sind.

*Nachdruck verboten.*

[From the Lister Institute, London.]

**The Phagocytosis of so-called neutral substances.**

**Experiments with Hippomelanin.**

**By J. C. G. Ledingham.**

With Plate I.

(Eingegangen bei der Redaktion am 2. Juni 1909.)

The ability of the leucocytes and endothelial cells of the vascular walls to take into their interior unorganised or so-called neutral particles like carbon, carmin, etc., when injected into the animal body, has long been recognised, and numerous experiments in vitro have demonstrated similar phenomena.

While the rôle of the blood serum in furthering the phagocytosis of bacteria has been the subject of much study during recent years, observations on similar lines in connection with the phagocytosis of physiologically neutral bodies have been few.

It has however, been shown in the case of carmin (Wright and Douglas), Carbon (Rosenthal and others), Melanin (Dudgeon and Shattock), Milk globules (Neufeld and Händel), that the serum plays a very important part in the phagocytosis of such particles and that in fact they are capable of opsonisation.

Whether the sensitisation of such bodies is strictly analogous to that of bacteria and takes place according to the same laws is a question which cannot yet be decided, especially as the ultimate processes involved in the phagocytic act are not thoroughly understood. The problem which led up to the following experiments suggested itself as a natural corollary to the demonstration of substances in serum which

can further the phagocytosis of neutral particles. Can these neutral bodies which are capable of opsonisation in vitro excite the formation of specific antibodies when introduced into the animal body? In other words will the blood serum of the immunised animal acquire a greatly enhanced power of opsonising these particles?

The substance chosen for experiment was Hippomelanin which is readily obtainable from cases of melanosis in the grey horse. The glands at my disposal had been preserved in spirit for many years. They were absolutely black and appeared to contain almost pure melanin with extremely few cellular elements from which the melanin could be freed with great ease. A small portion of the black mass was emulsified with normal saline in an agate mortar. After passage through filter paper the emulsion was centrifugalised and washed several times in order to get rid of any traces of alcohol or adherent organic elements, and finally autoclaved.

The granules were found to be of very uniform size and as Dudgeon and Shattock pointed out, lent themselves readily to accurate quantitative estimation in phagocytosis experiments. As experimental animals, guinea-pigs were chosen, although it would have been interesting in view of the source of the melanin to have employed horses. Three animals in all were treated with injections of melanin suspended in saline (about 4 c. c. at each injection).

In testing the opsonic content of the serum towards melanin during the process of immunisation, human leucocytes were employed and the period of incubation was as a rule 45 minutes.

The results of the various testings of the fresh immune sera will be given as indices, the controls being the sera of normal guinea-pigs of the same weight as the inoculated animals. Experiments made with the inactivated immune sera in order to determine the nature of the antibody developed in the inoculated animals, will then be detailed.

Before the commencement of immunisation the indices of the experimental animals were found to differ only very slightly from one another.

## Guinea-pig "A".

	Dates of injection	Dates of testings	Indices
1st	24. April 1907 (subcutr)	22. April 1907	1,0
2nd	27. " 1907 "	4. June 1907	3,1
3rd	5. June 1907 "	7. " 1907	2,9
4th	11. " 1907 "	14. " 1907	2,3
5th	19. " 1907 (intraper)	19. " 1907	2,1
6th	24. " 1907 "	24. " 1907	3,1

The animal was killed 5 $\frac{1}{2}$  hours after the 6th injection. The post-mortem appearances will be detailed later.

## Guinea-pig "B".

	Date of injections	Date of testings	Indices
1st	5. June 1907 (subcutr)	4. June 1907	1,0
2nd	11. " 1907 "	7. " 1907	1,0
3rd	19. " 1907 (intraper)	19. " 1907	0,71
		24. " 1907	2,1
4th	26. " 1907 "	26. " 1907	3,3
		1. July 1907	3,2

Guinea-pig "B" was killed on 1. July. The protocol will follow later.

## Guinea-pig "C".

This animal was kept under observation for a period of ten months. The same control animal was employed throughout the whole period.

	Date of injections	Date of testings	Indices
1st	24. June 1907 (intraper)	24. June 1907	1,0
2nd	26. " 1907 "	26. " 1907	1,7
3rd	1. July 1907 "	2. July 1907	0,86
4th	6. " 1907 "	16. " 1907	3,6
5th	16. " 1907 "	19. " 1907	1,9
		26. " 1907	4,4
		29. " 1907	6,0
6th	16. " 1907 (last injn.)	26. Nov. 1907	4,2
		29. " 1907	4,9
		17. Feby. 1908	3,8
		9. March 1908	4,5

It will be apparent from the above tables that in response to the inoculations the sera of all three animals acquired a greatly enhanced power of sensitising melanin. The actual numerical results obtained in two typical testing experiments may here be quoted:

Testing of sera "A" and "B" on 19. June 1907.  
Incubation 1 hr. at 37° C.

"A"	17,6	granules per leucocyte
"B"	5,9	" " "
Control "a"	8,2	" " "
" "b"	7,9	" " "

9\*

Testing of serum "C" on 16. July 1907.

Incubation 1 hr. at 37° C.

"C"	16.6	granules	per	leucocyte
Control	4.6	"	"	"
Normal Saline	1.8	"	"	"

The exact stage at which the index of the inoculated animals reached a level of 2 or 3 cannot be determined with accuracy, but it appears to be about the third or fourth week after the commencement of the injections. When the index has attained this level, further injections have not the effect of raising it much higher except in the case of Guinea-pig "C" where an index of 6 was once reached (on July 29, 1907). This animal received its final inoculation in August 1907 but the serum-testings performed during the succeeding seven months showed that no diminution of the index had taken place. In the absence of stimulation, the maintenance of a high level of immunity during such a long period is remarkable and would appear to indicate that the production of antibodies proceeds at a very slow rate. From our knowledge of the chemical properties of hippomelanin, however, notably its extreme insolubility one might expect that if it had the power of exciting the tissues to antibody-production at all, it would do so only slowly.

At this point it will be convenient to describe briefly the postmortem appearances in the two animals "A" and "B" which were killed at the close of the inoculation-period.

Guinea-pig "A" was killed 5½ hours after its final injection.

A brownish-black sausage-shaped mass, representing the curled up great omentum lay along the greater curvature of the stomach. Streaks of melanin granules rested on the surface of this mass and also on the mesentery. The spleen was not enlarged. Films prepared from scrapings of omentum showed large numbers of polynuclear and endothelial cells containing melanin granules in their interior. The phagocytic properties of the latter type of cell were specially conspicuous.

Films of peritoneal fluid showed melanin granules mainly in the polynuclear cells. There was very little free melanin. In films of spleen pulp a few polynuclear and mononuclear cells contained melanin. No melanin was present in the bone-marrow either free or included in cells.

Microscopic sections were made passing transversely through the gastric mucosa and the omental mass. Enormous numbers of phagocytes stuffed with melanin granules were seen but they were not distributed uni-

formly throughout the thickened serosa. They occurred in clusters in the more thickened portions of the reticulum where fibroblastic proliferation was most marked (vide Fig. I). In these areas the phagocytic cells were almost invariably of the mononuclear type but in many cases it was impossible to determine the shape of the nucleus owing to complete stuffing of the cell body with granules (vide Fig. II). A small quantity of melanin was lying free between the cells.

An interesting feature was the presence of several minute abscesses which were in process of being shut off by fibroblastic capsules. The cells in these abscesses (which were free from micro-organisms) were without exception polynuclear cells in different stages of disintegration. Some still contained melanin granules in their interior. Near the enclosing capsule were larger numbers of mononuclear cells stuffed with granules so that the appearance suggested a transference of the melanin from the disintegrated polynuclear cells to the mononuclear cells at the periphery. Melanin granules were not found in the interstitial tissue of the gastric mucosa. With regard to the granules themselves, no alteration in appearance and shape could be detected microscopically.

#### Guinea-pig "B".

The post-mortem condition was essentially similar to that of "A". The great omentum formed a sausage-shaped mass along the greater curvature of the stomach. Some enlarged brownish mesenteric glands were present in this neighbourhood.

The liver serosa showed thickened black nodular lymphatic swellings running in the minute fissures and along the free liver edge. Similar engorged lymphatics occurred in the capsules of the spleen and kidneys.

The bronchial and mediastinal glands were also brownish-black on section.

Lymph gland pulp was examined in saline solution and beautiful specimens of melanin-containing cells were seen. They were mainly of endothelial type.

It may be inferred then that the chief storehouse of the injected melanin is the great omentum, the lymph-glands and spleen being only secondary depôts. As to the ultimate fate of the melanin, had the animals been allowed to live longer, it is impossible to decide. The third animal "C" died during my absence and unfortunately no autopsy was made.

#### Experiments with inactivated immune serum.

It has been shown that the fresh unheated sera of the immunised animals contained, relatively to control sera, a much greater amount of a substance which furthered the phagocytosis of melanin. To this substance we shall give

provisionally the name of "melanopsonin". It remained to be determined whether this body behaved towards inactivation and complementing like an amboceptor.

The three following experiments were made with the view of estimating the so-called tropic content of the immune sera. In all three experiments the inactivated immune sera were employed in the undiluted condition.

Experiment I. 7. June 1907.

	Incubation	Granules per leucocyte
"A" inactivated	1 hr. 50 min.	2,3
"A" "	5 " 10 "	5,1
"B" "	1 " 50 "	0,5
"B" "	5 " 10 "	1,4

"B" had received its first injection two days previously to this experiment.

"B" serum contains only about a fourth of the amount of active thermostable substance shown by "A".

Experiment II. 17. June 1907.

Incubation time = 1 hr.

	Granules per leucocyte
"A" inactivated serum of 10. June	4,0
"A" " " 17. "	4,1
"B" " " 10. "	1,3
Control serum inactivated	0,9

It will be seen that "A" still contains more than three times as much tropic substance as "B" and about 4—5 times as much as the control.

Experiment III. 26. June 1907.

In this experiment the undiluted fresh and inactivated sera of "B" and "C" were compared.

Incubation time = 1 hr.

	Granules per leucocyte
"B" unheated serum of 26. June	16,2
"B" inactivated of serum 26. June	1,0
"C" unheated serum of 26. June	8,4
"C" inactivated of serum 26. June	1,3
Control unheated serum of 26. June	4,9

Inactivation has apparently a much greater effect on the melanopsonin of "B" than on that of "C", but in both cases the active tropic substance is almost negligible in comparison with the opsonic substance of the fresh serum.

In the next series of experiments the effect of reactivating the heated immune sera by addition of fresh complement will be shown. Before the phagocytic test, normal guinea-pigs serum and inactivated undiluted immune serum were digested together in equal proportions for 30—60 minutes at 37° C. Thereafter, equal volumes of the melanin emulsion, leucocytes, and immune-serum-complement mixture were incubated for 1 hour at 37° C. Appropriate controls were also made.

## Experiment I. 29. July 1907.

"C" serum inactivated	— Compl.	(1 in 4)	3,0	granules per cell
"C" "	— Compl.	(1 in 2)	3,9	" " "
"C" "	— Compl.	(undiluted)	5,4	" " "
"C" serum fresh	— Saline		4,8	" " "
"C" serum inactivated	— Saline		0,8	" " "
Complement fresh	— Saline		0,8	" " "

The effect of complementing the inactivated immune serum is apparent, the maximum phagocytosis being obtained by the use of undiluted complement.

Another series made on the same date with a different melanin emulsion gave the following figures:

"C" serum inactivated	— Compl.	7,1	granules per cell
"C" serum fresh	— Saline	7,0	" " "
"C" serum inactivated	— Saline	1,6	" " "
Complement	— Saline	3,1	" " "

The reactivation of the heated immune serum was thus complete.

## Experiment II. 26. November 1907.

The immune serum employed on this date was that of "C" at a period of three months after its final inoculation.

Reactivation of the heated immune serum gave an effect markedly exceeding that of the fresh serum alone.

"C" serum inactivated	— Compl.	15,2	granules per cell
"C" serum inactivated	— Saline	1,2	" " "
"C" serum fresh	— Saline	13,1	" " "
Complement fresh	— Saline	3,1	" " "
Complement heated	— Saline	0,3	" " "

## Experiment III. 9. March 1908.

The serum employed was that of "C" drawn eight months after its final inoculation.



Heated complement was employed instead of saline as a diluent so that in all the tubes the concentration of serum (as such) remained the same.

"C" serum inactivated — Fresh Compl.	8,5	granules per cell
"C" serum inactivated — Heated Compl.	2,3	" " "
"C" serum fresh — Heated Compl.	7,3	" " "
Complement fresh — Heated Compl.	1,6	" " "

The reactivation was again more than complete.

### Absorption experiments.

#### Experiment I.

The following experiment was designed to test whether an inactivated immune serum which had been digested with melanin, could subsequently be complemented.

One volume of inactivated "C" serum was digested with an equal volume of melanin emulsion at 37° C. for 1 hr. 35 min. (Fluid "a").

As control a volume of the same serum was diluted in equal parts with saline (Fluid "b").

After digestion "a" was centrifugalised and the melanopsonin-content of the resulting supernatant fluid was tested against that of "b".

Result:

"a"	0,3	granules per cell.
"b"	0,3	" " "

Complement was now added to "a" and "b" and digested therewith for 30 minutes at 37° C.

The melanopsonin-content of the two fluids was then examined.

Result:

"a" (Complemented)	1,9	granules per cell.
"b"	5,0	" " "

Evidently no complementing of "a" had taken place owing to the absorption of the melanin amboceptors by the previous digestion.

#### Experiment II.

In this experiment heated complement which had been also absorbed with melanin was employed as control.

Inactivated "C" serum and inactivated normal serum (complement) were digested with equal volumes of melanin-emulsion at 37° C for 2 hours. The fluids were then centrifugalised and fresh complement added to each in equal proportions.

The melanopsonin-content of the two fluids was now estimated, a fresh melanin-emulsion being used.

Result:

- 1) Inactivated "C" serum (after digestion with melanin) + Compl.  
2,4 gran. per cel.
- 2) Inactivated Normal (after digestion with melanin) + Compl.  
7,8 gran. per cel.

Again no complementing took place in (1) but the figures would suggest the presence of a complement-deviating body in the supernatant fluid after digestion of the immune serum with melanin. Evidently no such body was present in (2).

Another experiment carried out in the same way yielded the values 1,6 and 2,7 for (1) and (2) respectively. These figures are not significant enough but they certainly show that an immune serum which had been digested with melanin, was incapable of being complemented.

#### Complement-fixation by the haemolytic method.

Two tubes containing respectively inactivated immune serum and heated complement were digested with melanin and fresh complement for 30 minutes at 37° C.

To each tube were now added ox-amboceptor and guinea-pig's corpuscles (2 hours at 37° C).

Definite haemolysis took place in the control tube but none occurred in the tube containing the immune serum, showing that the melanin-amboceptor combination had fixed the complement and accordingly prevented haemolysis.

#### Summary and Conclusions.

Hippomelanin when injected into the animal body is able to excite the tissues to the production of an antibody having the properties of an opsonin (melanopsonin).

Agglutinins are developed only to a very slight extent, the immune serum attaining an agglutination-titre not exceeding 1 in 20 even after 24 hours contact with the granules.

The immune serum when inactivated loses a large part of the substance which furthers phagocytosis, but the remaining tropic effect is much greater than that of heated normal serum.

When complement is added to the inactivated immune serum, phagocytic values are obtained exceeding those of the fresh immune serum, showing that the immune serum contains a large amount of amboceptor capable of being complemented by fresh normal serum.

No satisfactory explanation can at present be given of the results obtained in the above experiments. That a body so intractable chemically as hippomelanin, should yet be able in the animal body to excite the production of a specific anti-

body is sufficiently remarkable to warrant a further study of the so-called inert substances.

According to v. Fürth and Jerusalem (1907) in their recent work on hippomelanin, this substance is extraordinarily resistant to chemical agents and by its insolubility in concentrated caustic alkali is readily distinguished from the melanin of epidermal origin and the melanin of malignant tumors. One must always bear in mind, however, the possibility that the body tissues may possess powers of an entirely different order from those of the pathological chemist of dealing with intractable matter like melanin. The following suggestion may at any rate be offered to be at once refuted.

The melanin granules inoculated into the animal body may still have possessed a coating of equine proteid material and the resulting immune body (though revealed only by its opsonic property with regard to the melanin granules, may in reality have been an antibody to the foreign horse serum. This suggestion is however unlikely when one considers that the tumors from which the granules were prepared had been kept in spirit for many years (and that the infinitesimal quantity of proteid coating the granules could hardly have been potent enough to excite such a marked response as evidenced by the action of the immune serum.

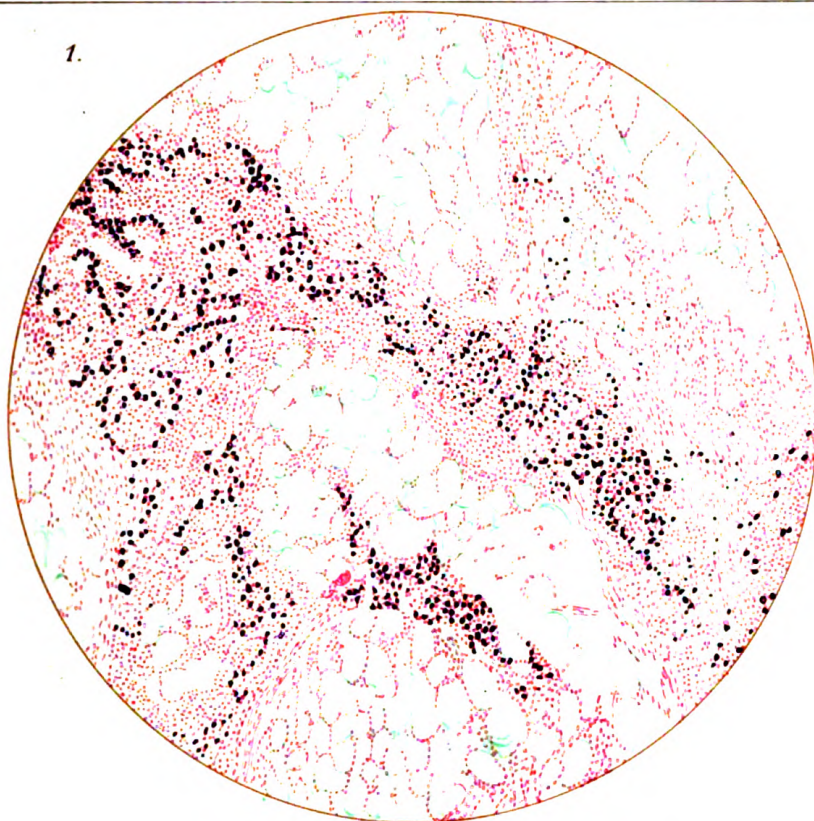
It has been shown (by v. Fürth) that artificial melanin prepared by acting on tyrosin with (tyrosinase corresponds closely in its chemical constitution and properties with hippomelanin. A quantity of this artificial substance is at present at my disposal and it is proposed in future experiments to compare its action in the animal body with that of the naturally occurring hippomelanin.

#### Zusammenfassung.

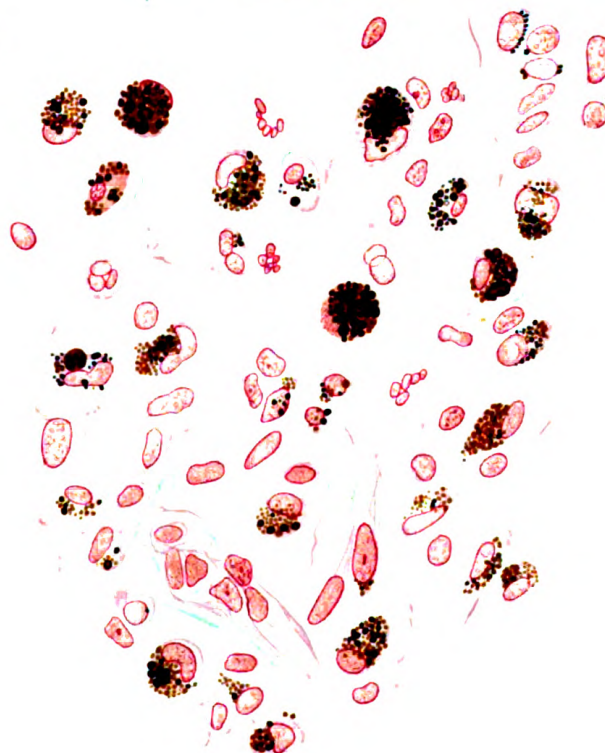
Wenn man Hippomelanin dem tierischen Körper (Meerschweinchen) einverleibt, so kann dieses zu Produktion eines Antikörpers im Blutserum anregen, welcher die Eigenschaften eines Opsonins besitzt.

Agglutinine entwickeln sich nur in sehr geringem Grade. Das Immunserum erhält einen Agglutinationstiter, welcher

1.



2.



Ledingham.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Lith. Anst. v. Johannes Arndt, Jena.



selbst nach 24 Stunden langer Einwirkung auf die Granula 1:20 nicht übersteigt.

Nach Inaktivierung verliert das Immunserum einen großen Teil der opsonischen Substanz, aber die zurückbleibende tropische Wirkung ist noch viel größer als die des inaktivierten Normalserums.

Wenn man dem inaktivierten Immunserum Komplement zufügt, so bekommt man phagocytische Werte, die die des frischen Immunserums übersteigen — ein Beweis, daß das Immunserum Ambozeptoren enthält, die durch frisches Normalserum komplementiert werden können.

Eine zufriedenstellende Erklärung der Resultate der obigen Versuche kann vorläufig nicht gegeben werden.

Daß ein Körper, so unangreifbar wie Hippomelanin, doch fähig sein sollte, einen spezifischen Antikörper zu erzeugen, bietet sicher zureichendes Interesse, um ein weiteres Studium der sogenannten neutralen Substanzen zu rechtfertigen.

Die Versuche werden mit künstlichem Melanin (Wirkung von Tyrosinase auf Tyrosin) fortgesetzt.

#### References.

- Rosenthal (1908), Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 42, Beilage, p. 177.  
Wright and Douglas (1903), Proc. Roy. Soc., Vol. 72, p. 357.  
Dudgeon and Shattock (1908), Proc. Roy. Soc., Series B, Vol. 80, p. 165.  
Neufeld and Händel (1908), Arb. a. d. Kais. Gesundh., Bd. 28, p. 582.  
v. Fürth und Jerusalem (1907), Hofmeisters Beiträge, Bd. 10, p. 131.

#### Plate I.

- Fig. I. Section of Great Omentum showing distribution of melanin cells.  
Leitz, Oc. 4, Obj. 3. Stain Licht-Grün-Neutral-Rot.  
Fig. II. Section showing mononuclear cells filled with melanin granules.  
Leitz, Oc. 4, Obj.  $\frac{1}{11}$ . Stain Licht-Grün-Neutral-Rot.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Prof. Hofrat R. Paltauf.]

### **Ueber die Wirkung des intraokulär injizierten rabiziden Serums<sup>1)</sup>.**

Von Prof. **R. Kraus** und Dr. **Th. Holobut** (Lemberg).

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. Juni 1909.)

In zahlreichen früheren Versuchen konnte festgestellt werden, daß rabizides Serum (gewonnen mit Lyssavirus von Kaninchen, Schafen, Pferden, Hunden) wohl imstande sei in vitro Virus zu zerstören, nicht aber im Organismus (wenn Virus und Serum getrennt injiziert wurden). Selbst wenn Virus und Serum getrennt, gleichzeitig injiziert wurden, gelang es nicht mit großen Serummengen (des in vitro sehr wirksamen Serums), Tiere vor dem Ausbruch der Lyssaerscheinungen zu schützen. Auch bei Benutzung des subkutan infektiösen Virus fixe Fermi gelang es uns nicht, Tiere nach subkutaner, intravenöser Seruminjektion am Leben zu erhalten. Es könnten diese Serumversuche dafür sprechen, daß das Serum nicht in Nerven oder in das Zentralnervensystem eindringen dürfte oder daß es das in nervösen Zellelementen lokalisierte Virus nicht mehr zu beeinflussen vermag. Einen gleichen Standpunkt vertreten, wie bekannt, bezüglich des Tetanusantitoxins H. Mayer und Ransom, in letzter Zeit Pochhammer.

In den früheren Versuchen wurde Virus entweder subdural, intravenös (N. ischiadicus), intraokulär oder subkutan injiziert, Serum subkutan, intravenös und intraspinal. In neuen Versuchen haben wir uns der cornealen Infektion bedient, die, wie die Versuche von Kraus und Fukuhara gezeigt haben, konstant Lyssa hervorruft. Das in vitro zuerst

---

1) Ueber diese Versuche wurde in der Diskussion anschließend an Römers Vortrag in der Sitzung der freien Vereinigung für Mikrobiologie, 3. Juni 1909, Wien, berichtet. Wiener klin. Wochenschr., 1908.

auf sein rabizides Vermögen geprüfte Serum (0,05—0,01) wurde intravenös, intraokulär und conjunctival appliziert.

### 1. Versuch am 25. April.

Serum intravenös, nach 18 Stunden corneale Infektion  
(linke Cornea) Virus fixe filtriert 1:10.

Kan. 160	10 ccm	Ser. intrav. nach 24 Std. corneale Inf.,	10. V. Lyssa, †
" 244	10	" " " " 24 " " "	2. Lyssa, † 3.
" 443	5	" " " " 24 " " "	† 29.
Kontrolle			9. Lyssa, † 10.

### 2. Versuch am 7. Mai.

Serum intravenös, gleichzeitig Virus corneal.

Kan. 150	5	Serum intravenös, gleichzeitig Virus corneal,	14. Lyssa, † 17.
" 221	5	" " " " " " "	14. " † 17.
" 358	5	" " " " " " "	14. " † 17.
" 120	10	" " " " " " "	13. " † 14.
" 77	10	" " " " " " "	14. " † 15.
Kontrolle	{ 273		15. " † 16.
	{ 229		14. " † 16.

Diese Versuche zeigen, daß intravenös injiziertes Serum (10 ccm) in die Cornea eingebrachtes Virus nicht schädigt, ebenso wie wenn Virus subdural, intravenös oder subkutan injiziert worden wäre. Ganz andere Resultate erhält man, wenn Serum intraokulär in die vordere Augenkammer injiziert wird.

### Versuch.

0,1 Serum intraokulär, gleichzeitig Virus corneal filtriert 1:10.

Kan. 26	0,1	Serum intraokular, gleichzeitig Virus corneal, lebt	
" 420	0,1	" " " " " " "	" "
" 228	0,1	" " " " " " "	" "
" 496	0,1	" " " " " " "	" "
" 143	0,1	" " " " " " "	" "
" 227	0,1	" " " " " " "	" "
" 370	0,1	" " " " " " "	" "
" 445	0,1	" " " " " " "	" "
" 28	0,1	" " " " " " "	" "

### Kontrollversuche.

Kan. 388	0,1	normales Pferdeserum intraokular, Virus corneal, Lyssa, †	
" 266	0,1	" " " " " " "	" "
" 6	0,1	" " " " " " "	" "
" 347	0,1	" " " " " " "	" "
" 187		ohne Serum, Virus corneal	" †
" 34		" " " " " " "	" "
" 382		" " " " " " "	" "



Intraokulär injiziertes rabizides Serum vermag demnach bei gleichzeitiger cornealen Infektion Virus zu zerstören und die Lyssa zu verhüten. Es muß demnach das Serum von der Augenkammer aus in die Cornea eindringen und das Virus daselbst beeinflussen können. Daß das intravenös injizierte Serum keine Wirkung gezeigt hat, dürfte vielleicht mit der Verdünnung des Serums zusammenhängen, da Römer<sup>1)</sup> von der Blutbahn aus mit Antitoxin das in die Cornea eingebrachte Diphtherietoxin zu neutralisieren vermochte. In dieser Richtung müssen fortgesetzte Versuche noch Aufklärung bringen.

Wir haben Serum verschiedene Zeit nach der cornealen Infektion intraokulär injiziert. Nach früheren Versuchen von Kraus und Fukuhara und nach Versuchen, welche Königstein und Holobut ausgeführt haben, ist das subkutan und corneal injizierte Virus nach 6 Stunden in den großen Nervenstämmen (Ischiadicus, Opticus), und die Durchschneidung dieser Stämme nach dieser Zeit verhütet die Lyssa nicht. 1—2 Stunden nach cornealer Infektion gelingt es durch intraokuläre Injektion des Serum die Lyssa zu verhüten; wird später Serum injiziert, so bekommen die Tiere typische Lyssa.

#### Versuch.

Kan.	20	Virus corneal	filtriert	1:10,	nach	2	Std.	Ser. intraokular,	lebt
"	389	"	"	"	1:10,	"	2	"	"
"	224	"	"	"	1:10,	"	5	"	"
									Lyssa

Es dürfte dieser Versuch dafür sprechen, daß das Virus auch in den cornealen Nerven noch vom Serum beeinflußt werden dürfte, da ja 1 und 2 Stunden nach der cornealen Infektion Virus bereits in die Nerven eingedrungen sein dürfte. Mit Sicherheit läßt sich diese Frage nicht entscheiden. Es ist möglich, daß Virus bloß außerhalb der Nerven noch vom Serum zerstört wird, aber auch die Möglichkeit muß zugestanden werden, daß Serum in die Nerven eindringt und hier das Virus zerstört. Warum es nicht gelingt, das subkutan einverleibte Virus mit großen Serummengen bei präventiver oder gleichzeitiger Injektion in die Blutbahn, nament-

1) Vortrag, gehalten auf der Tagung der freien Mikrob. Vereinigung in Wien, 1909.

lich nach der cornealen Infektion zu beeinflussen, ist in Berücksichtigung dieser Versuche schwer zu entscheiden. Die von uns eingangs gemachte Annahme, daß Serum nicht in die Nerven eindringe und deswegen unwirksam sei, kann nach Ausfall dieser Versuche nicht strikte aufrecht erhalten werden.

#### **Zusammenfassung.**

Durch intravenöse, subkutane präventive oder gleichzeitige Injektion eines in vitro wirksamen rabiziden Serums kann man das intranervös (N. isch.), subdural, subkutan, corneal einverleibte Virus bei Kaninchen nicht schädigen, die derart infizierten Tiere erkranken an Lyssa.

Wird aber Serum intraokulär gleichzeitig oder 1—2 Stunden nach cornealer Infektion injiziert, so bleiben die Tiere am Leben, die mit normalem Serum intraokulär injizierten gehen an Lyssa zugrunde.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

#### **Ueber die Giftigkeit der Serumhämolyse und über Kriterien des anaphylaktischen Zustandes.**

Von Prof. R. Kraus.

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. Juni 1909.)

Im vorliegenden soll bloß gezeigt werden, daß es nicht angeht, den sogenannten anaphylaktischen Shock allein bei Meerschweinchen und Kaninchen als etwas Pathognomonisches zu erklären und auf derartige, in unmittelbarem Anschluß an die Injektion verschiedener Substanzen, besonders Sera auftretende Reaktionen die Diagnose des anaphylaktischen Zustandes ausschließlich zu basieren. Dies erscheint um so notwendiger, als in den meisten neueren Arbeiten, Symptome wie

Koma, Dyspnöe, oder Exitus innerhalb der ersten Stunde als beweisend für das Bestehen von Anaphylaxie angenommen werden, gleichgültig, ob die ganze Versuchsanordnung für oder gegen diese Annahme spricht.

### I.

Zunächst sei an die akute Giftwirkung hämolytischer Sera der alten Arbeiten von Belfanti und Carbone erinnert, die später durch Cantacuzène, Bordet, Gruber, Kraus und Sternberg, Batelli ergänzt und vertieft wurden.

Belfanti und Carbone machten folgende Wahrnehmung: Behandelt man ein Pferd mit steigenden Dosen Kaninchenblut intraperitoneal, so gewinnt das Serum dieses Pferdes eine hohe Giftigkeit für Kaninchen. 4 ccm dieses Serums, endovenös injiziert, töten Kaninchen in wenigen Minuten unter Krämpfen, Dyspnöe und tiefem Koma. Die subkutane Injektion von 2—5 ccm war gleichfalls letal; doch trat der Tod erst nach 24—36 Stunden ein. Meerschweinchen reagieren dagegen auf ein solches Serum nicht, oder erst auf hohe Dosen (1—15 Proz. des Körpergewichtes).

Desgleichen ließen sich für Kaninchen toxische Sera gewinnen von Meerschweinchen oder Hunden, die man mit Kaninchenblut vorbehandelt hatte.

Belfanti und Carbone formulieren daher folgendes Gesetz: Das Serum eines Tieres der Species A, welches mit defibriniertem Blute eines Tieres der Species B intraperitoneal vorbehandelt wurde, wirkt toxisch auf Tiere der Species B, hat gar keine Wirkungen auf solche der Species A und nur schwach giftige auf Tiere einer anderen Species X.

Die Autoren halten es für wahrscheinlich, daß die Produktion der toxischen Substanzen an die roten Blutkörperchen gebunden sei, da sie durch Injektion von bloßem Kaninchen-serum nie ein für Kaninchen giftiges Serum erhielten, haben aber über den Mechanismus der Giftwirkung keine bestimmte Vorstellung. Erst Bordet und Cantacuzène zeigten, daß die Sera von Belfanti und Carbone hämolytisch wirken, und zwar nicht nur in vitro, sondern auch im Organismus. Kaninchen, denen man geringe Mengen solcher hämolytischer

Sera intravenös injiziert (2—3 ccm), zeigen schon nach 1 Stunde eine Abnahme Erythrocyten von 6 Millionen auf 1 500 000, nach 36 Stunden auf 600 000, nach 48 Stunden auf 300 000. Desgleichen fand Gruber bei Meerschweinchen, denen er 4—10 ccm inaktives hämolytisches Immunserum ins Peritoneum spritzte, nach 8—12 Stunden Hämoglobinurie und Herabminderung der Erythrocyten von 5 auf 0,9—0,8 Millionen. Er glaubt, die Todesursache müsse in der Verminderung der Erythrocyten in der Volumeinheit zu suchen sein, auch dann, wenn keine Hämolyse, sondern bloß Agglutination eintritt, weil dann die agglutinierenden Körperchen in den Kapillaren und in den Lakunen der Milz etc. stecken bleiben. Der konsekutive Sauerstoffmangel der Gewebe durch verminderten Gasaustausch in den Lungen führe schließlich zum Exitus.

Ähnliches beschrieben Kraus und Sternberg bei Hunden. Wir konnten zeigen, daß hämolytische Sera, gewonnen mit Hundebutkörperchen von Kaninchen, intravenös Hunden injiziert, einen akuten Tod innerhalb 15—20 Minuten herbeiführten.

Wir haben nun diese Versuche neuerlich aufgenommen und konstatiert, daß die nach endovenöser Injektion hämolytischer Immunsera auftretenden Symptome völlig jenen gleichen, welche anaphylaktische Tiere nach der Probeinjektion darboten.

Zunächst wurden Kaninchen mit defibrinierten Hundebut intraperitoneal wiederholt injiziert und 9—12 Tage nach der letzten Injektion entblutet. Das resultierende Serum wurde gesunden Hunden in eine Vena jugularis gespritzt, und zwar in Mengen von 5—10 ccm. Sofort nach der Injektion traten Paresen der Extremitäten auf, richtiger ausgedrückt, Erschlaffungen der willkürlichen Muskulatur, die Tiere erbrachen wiederholt und ausgiebig entleerten Harn, defäzierten mehrere Male, schwankten, fielen um oder streckten sich nieder, schlossen die Augen und verfielen oft in schweres Koma. Ein Teil starb im Koma nach 1—2 Stunden, andere erholten sich nach kurzer Zeit, etwa 30 Minuten, standen auf und boten bald kein von den Kontrollen abweichendes Verhalten. Wie man sieht, eine

**völlige Analogie zum anaphylaktischen Shock, auch in bezug auf den raschen Uebergang vom Koma in Genesung.**

**Versuch.**

a) Kan. 19 am 3., 9., 18., 31. Okt., 9. Nov. mit defibriniertem Hundeblut injiziert, am 18. Nov. entblutet. Sein Serum wirkt, wie folgt:

Hund I, 10 ccm intravenös nach ca. 10' Ataxie, Paresen, Koma, erholt sich nach 20' scheinbar, verendet aber in 2 Stunden. 2 andere Hunde erbrachen nach derselben Dosis sofort, hatten Stuhl, wurden komatös und starben im Koma nach 2 Stunden.

b) Kan. 186 erhält am 3., 9., 18. Okt. je 10 ccm defibriniertes Hundeblut, wird am 28. Okt. entblutet. Vom Serum bekommt

Hund II 5 ccm, † nach ca. 30' im Koma;

Hund III 5 ccm intravenös, sofort nach der Injektion Paresen, Koma, erholt sich nach 30'. Nach 2 Tagen wird er verendet aufgefunden.

c) Kan. 75 in gleicher Weise immunisiert wie Kan. 186, aber erst am 20. Okt. entblutet.

Hund IV, erhält 9 ccm dieses Serums intravenös, hat sofort nach der Injektion Erbrechen, Paralyse, Koma, erholt sich nach ca. 1 Stunde.

Diese für Hunde toxischen Kaninchensera waren für andere Tiere unschädlich, indem z. B. ein Kaninchen von 1000 g die intravenöse Injektion von 5 ccm des Serums 186 ohne krankhafte Erscheinungen vertrug, ebenso wie ein Meerschweinchen von 400 g.

Ferner konnte gezeigt werden, daß die Giftigkeit mit den hämolytischen Eigenschaften zusammenhing, da präzipitierende, ja sogar agglutinierende Antihundesera keine Wirkung hatten.

**Versuch.**

Kan. 466 bekam wiederholt Hundeserum und wurde 11 Tage nach der letzten Injektion entblutet. Sein Serum vermochte 1 ccm 5-proz. Hundeblutaufschwemmung auch in Mengen von 0,5 ccm nicht zu lösen, agglutinierte aber Hundeerythrocyten noch in Dosen von 0,05, und gab mit 100-fach verdünntem Hundeserum Präzipitate.

Hund V erhält 5 ccm dieses Serums von Kan. 466 intravenös, ist nach der Injektion etwas matt, zeigt aber keine auffälligen Symptome, und bleibt auch weiteres gesund.

Hund V erhält 10 ccm intravenös — keinerlei Erscheinungen.

Dieselben Resultate lieferte das Serum von Ziegen, welche mit Kaninchenblut immunisiert waren. Ein derartiges Serum

erweist sich für Kaninchen bei intravenöser Injektion toxisch; die Symptome sind in jeder Beziehung identisch mit den Erscheinungen, welche Arthus an den gleichen Versuchstieren sah, wenn sie wiederholt mit Pferdeserum sensibilisiert und schließlich intravenös injiziert wurden. Auch auf hämolytische Immunsera reagieren Kaninchen mit heftiger Dyspnoë, legen sich auf die Seite, werden komatös, bekommen oft intensive Krämpfe und verenden nach wenigen Minuten.

#### Versuche.

Ziege 27, wiederholt immunisiert mit defibriniertem Kaninchenblut.

1. Aderlaß am 12. Dez.

Kan. 470	intravenös	5,0,	† in 5'
" 157	"	2,0,	keinerlei Erscheinungen
" 85	"	0,5	" "

2. Aderlaß vom 1. April.

Kan. 701	intravenös	6,0,	† in 5'
" 700	"	4,0,	† in 5'
" 358	"	2,5,	krank, Dyspnoë, erholt sich in 20 Minuten
" 478	"	2,0,	keinerlei Erscheinungen

Das 1 Stunde auf 58° C erwärmte inaktivierte Serum wirkte ebenfalls toxisch, wie schon nach den Versuchen Grubers zu erwarten war.

Auch folgender Versuch zeigt, daß die Giftwirkung dieser Sera nur mit der hämolytischen Eigenschaft dieses Serums zusammenhängen kann.

Es wurden Kaninchen mit gewaschenen Rinderblutkörperchen vorbehandelt, und 20 Tage später wurden sie mit gewaschenen Rinderblutkörperchen intravenös nachinjiziert; während die Kontrolltiere, welche bloß Rinderblutkörperchen bekamen, gesund geblieben sind, gingen die vorbehandelten Kaninchen akut zugrunde. Injektion von Rinderserum oder Blut anderer Tierarten hatte gar keine Wirkung.

Auch hier müssen wir die akuten Erscheinungen in Zusammenhang mit den Hämolysinen bringen, und sollten sie nicht ohne weiteres als anaphylaktische auffassen, wie es in jüngster Zeit U. Friedemann tut.

Trotzdem Friedemann die Auslösung der Anaphylaxie durch ein Gemisch von Blut und hämolytischem

Serum gelingt, was wir bei der Serumanaphylaxie bisher nicht kennen (Sensibilisin + Antisensibilisin gemischt, erzeugen bei gesunden Tieren keine Anaphylaxie), trotzdem er die Antianaphylaxie vermißt, hält er daran fest, die durch hämolytisches Serum ausgelösten Erscheinungen als anaphylaktische anzusehen. Wenn auch Friedemann zeigen will, daß die Hämolyse der Blutkörperchen nicht die Ursache des Vergiftungsbildes sein dürfte, so muß doch daran gedacht werden, daß die durch Ambozeptor + Komplement geschädigten Blutkörperchen, ähnlich wie es von Coca beschrieben wurde, eine mechanische Verstopfung des kleinen Kreislaufes bewirken und die Erscheinungen bedingen.

Auch Normalsera, welche Hämolsine für Blutkörperchen bestimmter Tierarten enthalten, wirken natürlich gleichfalls toxisch auf die betreffende Tierart. Nur sind entsprechend der meist schwächeren Wirkung der Normalhämolsine hohe Dosen notwendig, um Erscheinungen auszulösen, welche dem sogenannten anaphylaktischen Shock gleichen, oder den Exitus herbeizuführen.

So wirkt normales Ziegenserum giftig auf Kaninchen, allerdings erst in höheren Dosen, als das hämolytische.

Immunserum der Ziege 27.

Kan. 292 intravenös 10,0 normales Ziegenserum, † in 10'  
 „ 277 „ 5,0 „ „ leicht krank, erholt sich.

Wie einleitend bemerkt wurde, sind die „anaphylaktischen“ Reaktionen nach subkutaner Injektion bisweilen bloß lokal,

Kaninchen	33	präven. intraperitoneal	5,0	normales Pferdeserum, nach	24 <sup>b</sup>
„	12	„	5,0	„	24 <sup>b</sup>
„	6	„	5,0	„	24 <sup>b</sup>
„	7	„	5,0	„	24 <sup>b</sup>
„	10	„	1,0	„	24 <sup>b</sup>
„	14	„	1,0	„	24 <sup>b</sup>
„	320	„	5,0	Serum Kamee (Choleras.),	24 <sup>b</sup>
„	11	„	3,0	„	24 <sup>b</sup>
„	240	„	5,0	„	24 <sup>b</sup>
„	8	„	3,0	„	24 <sup>b</sup>

so z. B. wenn man Kaninchen oder Meerschweinchen, welche mit Pferdeserum sensibilisiert sind, kleine Dosen Pferdeserum subkutan einspritzt (Arthus, v. Pirquet und Schick, Lewis). Ganz dieselben Oedeme mit Uebergang in Nekrosen und Geschwürsbildung erzielt man aber auch durch Injektion hämolytischer Immun- oder Normalsera (Uhlenhuth, Pfeiffer). So erzeugt beispielsweise normales Rinderserum bei Meerschweinchen Infiltrate und Nekrosen, ebenso wie hämolytisches Ziegenserum bei Kaninchen.

## II.

Aber noch in einer anderen Richtung müssen wir bezüglich der Deutung von klinischen Erscheinungen als anaphylaktische Symptome zur Vorsicht mahnen. In letzter Zeit wird vielfach der Versuch gemacht, anaphylaktische Reaktionskörper bei Krankheiten des Menschen durch passive Uebertragung auf das Meerschweinchen nachzuweisen. Folgende Versuche sollen lehren, daß die heterologe passive Uebertragung nicht ohne weiteres berechtigt, die klinischen Erscheinungen zu Schlußfolgerungen auf Anaphylaxie heranzuziehen.

Wir konnten zeigen, daß man durch präventive und zwar bloß 24 Stunden früher erfolgte Injektion normalen Pferdeserums, ja sogar steriler Bouillon in die Peritonealhöhle von Meerschweinchen und Kaninchen die Reaktionsfähigkeit dieser Tiere derart ändern kann, daß solche Meerschweinchen oder Kaninchen nunmehr mit Shock auf Substanzen reagieren, welche von gesunden unvorbehandelten Tieren ohne Anstand vertragen werden.

2,0 Meningokokkenextr.,	keine unmittelbaren Erscheinungen, in 24 <sup>b</sup> †
2,0 Nasikextrakt,	" " " " " " 24 <sup>b</sup> †
2,0 Typhusextrakt,	Dyspnöe, legt sich auf die Seite, Laufbewegungen, † in 5'
5,0 Pferdeserum Kamee,	keinerlei Erscheinungen
2,0 Typhusextrakt,	Zuckungen, Dyspnöe, liegt auf der Seite, nach 1 <sup>b</sup> †
2,0 "	nach 5' krank, nach 2 <sup>b</sup> †
2,0 Diphtherieagarextr.,	keinerlei Erscheinungen
2,0 "	
2,0 Choleraagarextrakt,	sofort Dyspnöe, krank, liegt, † in 24 <sup>b</sup>
2,0 Typhasagarextrakt,	keinerlei Erscheinungen.



Bei Durchsicht der Protokolle zeigt sich ohne weiteres, daß man durch peritoneale Vorbehandlung mit Normalserum, Bouillon Kaninchen und Meerschweinchen derart überempfindlich machen kann, daß sie auf Bakterienextrakte, die bei normalen Tieren unmittelbar keine Erscheinungen auslösen, nach Art der anaphylaktischen reagieren. Und doch wird es niemandem einfallen, hier von Anaphylaxie zu sprechen. Diese Befunde haben eine große Aehnlichkeit mit den bekannten Tatsachen, welche Heim und Preisich, Heilner beschrieben haben.

Es ergibt sich auch, wie vorsichtig man bei der Beurteilung der Experimente über passive Anaphylaxie<sup>1)</sup> sein muß. Der bloße Vergleich mit der Kontrolle 945 im ersten Versuch würde die Wirkung des (Kameeserums) Cholera-serum auf die nachfolgende Injektion von Choleraextrakt bei Meerschweinchen 488 und 880 als passive Anaphylaxie erscheinen lassen. Die Tiere 946, 794, 808 zeigen aber das Unsichere dieser Auffassung und die Notwendigkeit, bei derartigen Uebertragungen auch stets Kontrollen mit Normalserum oder heterologem Serum aufzustellen.

Ganz analoge Resultate konnten wir auch ermitteln, wenn wir statt der Typhus-, Choleraextrakte, Tuberkulin (alt) zu Versuchen verwendet haben. (Schon das Tuberkulin allein vermag bei intravenöser Injektion in gewissen Dosen Erscheinungen bei Kaninchen, Meerschweinchen auszulösen, die man aus dem bloßen Aspekt mit Anaphylaxie verwechseln könnte. Die Tiere bekommen dyspnoische Erscheinungen, legen sich auf die Seite und man glaubt, daß sie zugrunde gehen, nach einigen Minuten erholen sie sich und bleiben am Leben.) Behandelt man Meerschweinchen, Kaninchen mit normalem Hundeserum, Pferdeserum, Bouillon (5—10 ccm) peritoneal vor und injiziert nach 24 Stunden intravenös Dosen von Tuberkulin, welche ge-

---

1) In früheren Versuchen (Kraus und Doerr) über Bakterienanaphylaxie wurden gesunde Meerschweinchen mit Serum von vorbehandelten Meerschweinchen passiv behandelt. Das Serum der gleichen Tierart wurde verwendet. Nach neueren Versuchen, welche Dr. Schick und Nowotny im Institute ausgeführt haben, ist es überhaupt zweifelhaft, ob eine heterologe passive Anaphylaxie zu Recht besteht.

Versuche an Meerschweinchen.

A. Kontrolle: Meerschweinchen 945 1,0 Choleraagarextrakt intravenös keine unmittelbaren Erscheinungen.				
Meerschw. 821	präp. 5,0	Serum Mylight (Tetanuserum),	nach 24h 1,0	Choleraagarextr., keine wesentlichen Erscheinungen.
"	946 "	5,0 "	" "	1,0 "
"	794 "	5,0 "	Karl (Typhuserum),	" "
"	808 "	5,0 "	" "	1,0 "
"	488 "	5,0 "	Kamee (Choleraerum),	" "
"	880 "	5,0 "	" "	1,0 "
B) Meerschw. 820 präp. 5,0 normales Pferdeserum, " " 1,0 "				
"	917 "	5,0 "	" "	1,0 "
"	939 "	1,0 "	" "	1,0 "
"	982 "	1,0 "	" "	1,0 "
"	59 "	5,0 Bouillon	" "	1,0 "
"	911 "	5,0 normal. Kaninchenserum,	" "	1,0 "
"	1000 "	2,0 Serum Kamee (Choleraer.),	" "	1,0 "
"	974 "	1,0 "	" "	1,0 "
"	38 "	5,0 "	" "	1,0 "
"	967 "	1,0 "	" "	1,0 "

Versuche an Kaninchen.

Kontrollen: Kan. 18 2,0 Meningokokkenextrakt		keine unmittelbaren Erscheinungen, † in 24h.
"	10 2,0 Nasikextrakt	
"	9 2,0 Extr. v. Enterit. Gärtner	keine Erscheinungen, überlebt. nach 1h krank, nach 4h †.
"	16 2,0 Typhusextrakt	
"	419 2,0 Choleraextrakt	

sunden Tieren nichts machen, kann man sofort nach der Injektion Erscheinungen beobachten, welche wieder klinisch an die anaphylaktischen Erscheinungen erinnern. Die Tiere werden dyspnoisch, fallen um, liegen im Koma, aus dem sie sich in kurzer Zeit wieder erholen können, oder gehen in 5—15 Minuten zugrunde. Die Versuche, die hier mitgeteilt sind, haben auch praktisches Interesse. Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß bei der Prüfung von Seris, namentlich heterologen, auf anaphylaktische Reaktionskörper mittels passiver Anaphylaxie immer an die Möglichkeit einer Steigerung der Giftempfindlichkeit durch das heterologe Serum gedacht werden muß. Dadurch wird natürlicherweise der Nachweis des anaphylaktischen Reaktionskörpers (bei Krankheiten, bei immunisierten Tieren) wohl erschwert.

Diese Versuche und die mitgeteilten mit Hämolysinen mahnen daran, nicht ohne weiteres aus klinischen Erscheinungen allein auf Anaphylaxie zu schließen. Die klinischen Symptome der Anaphylaxie sind zu vieldeutig, als daß man aus diesen bloß die Anaphylaxie erschließen dürfte.

Wir verlangen für den exakten Nachweis der aktiven Anaphylaxie erstens die Spezifizität, d. h. die Auslösung der Erscheinungen nur durch eine bestimmte Substanz (qualitative Spezifizität) und durch Mengen einer Substanz, welche bei gesunden Tieren unmittelbar nach der Injektion keinerlei klinischen Erscheinungen auslösen (quantitative Spezifizität).

Gleiches gilt auch für die passive Anaphylaxie. Auch können wir von der Uebertragung der Anaphylaxie (passive Anaphylaxie) nur dann sprechen, wenn die angeführten Bedingungen erfüllt werden. Als ein weiteres kardinales Symptom müssen wir auch die spezifische Antianaphylaxie bezeichnen, die nach Ueberstehen des anaphylaktischen Shocks konstatierbar ist.

#### Zusammenfassung.

1) Serumhämolysine, intravenös injiziert, wirken akut giftig für Tiere, deren Blutkörperchen geschädigt werden.

2) Die Erscheinungen, durch hämolytische Sera hervorgerufen (bei Kaninchen, Hunden), sind gleich denjenigen, die wir als anaphylaktische Erscheinungen kennen.

3) Durch Vorbehandlung mit heterologem Serum, Bouillon werden Tiere für Cholera-, Typhusgifte, Tuberkulin überempfindlich. Bei diesen Tieren lösen Giftmengen, welche bei nicht vorbehandelten Tieren gar nicht oder erst nach Stunden giftig wirken, sofort schwere Erscheinungen aus und können zum Tode führen. Auch diese Erscheinungen könnten dem Verlauf nach als anaphylaktisch gedeutet werden.

4) Die aktive und passive Anaphylaxie sind spezifische Phänomene, welche von den pseudoanaphylaktischen Erscheinungen durch qualitative und quantitative Prüfungen unterschieden werden müssen. Auch die Antianaphylaxie bildet ein Kriterium des anaphylaktischen Zustandes.

#### **Literatur.**

U. Friedemann, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, 1909.

Kraus und Sternberg, Centralbl. f. Bakt., 1902.

Coca, Virch. Arch., 1909.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern; Direktor: Prof. Dr. W. Kolle.]

### **Weitere Untersuchungen zur Theorie und Praxis der Serodiagnostik bei Syphilis.**

Von Dr. **M. Isabolinsky**,  
Assistenten am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. Juni 1909.)

Unter den zahlreichen Autoren, die in der letzten Zeit Untersuchungen veröffentlicht haben über die Wassermann-Neisser-Brucksche Reaktion, finden wir mehrere, welche den Versuch gemacht haben, die ursprüngliche Methodik zu vereinfachen und vielleicht zu verbessern. Jeder von den Autoren steht natürlich auf dem Standpunkte, daß die Methode,

die er bringt, die vorteilhafteste sei. Wenn man aber die große Zahl der nach der Wassermannschen Technik ausgeführten Untersuchungen mit der Zahl der nach der Methode dieser Autoren angestellten Reaktionen vergleicht, so steht sicher hinter der ursprünglichen Methodik ein größeres und sicheres Beweismaterial. Allen diesen Vereinfachungsmethoden, mögen sie nun das Antigen durch künstliche Substanzen ersetzen oder auf andere Art und Weise die Methodik der Reaktion ändern, sollten, ehe sie in der Praxis zur Abgabe einer Diagnose verwertet werden, durch eigene Versuche mit der alten erprobten Methode von jedem, welcher die Serodiagnostik der Syphilis auszuführen hat, verglichen werden. Da wir über die feineren biologischen Vorgänge bei dieser Reaktion bisher gar nichts Bestimmtes wissen, ist es stets ungewiß, ob die angegebenen Ersatzmittel in jedem Falle völlig den natürlichen Gliedern der Reaktion gleichwertig sind. Da es schon jetzt sicher ist, daß bei der Syphilisreaktion nicht spezifische Produkte der Spirochäten allein die Reaktion auslösen, sondern daß es sich hierbei hauptsächlich um physiologisch-chemische Stoffe handelt, die im Körper der Syphilitiker im Gegensatz zur Norm sehr stark vermehrt sind, kann man annehmen, daß man vielleicht später diese Körper mit chemisch bekannten Substanzen ziemlich exakt messen kann. Vorläufig ist das aber nicht der Fall. Jede neue Methodik, die auf einer sicheren experimentellen Basis aufgebaut ist und einen sicheren Beweis für ihre Richtigkeit erbringen kann, wird stets mit Freude begrüßt werden, wenn sie die ursprüngliche Methodik vereinfacht und damit ihre praktische Ausübung erleichtert. Aber solange eine derartige Methode nicht gefunden ist, ist vor der Einführung einer Vereinfachung, die unsichere oder weniger konstante Resultate aufzuweisen hat, dringend zu warnen, und man sollte sich lieber streng an die alte Methode, trotz ihrer Kompliziertheit, halten. Diese Behauptung wird man um so leichter verstehen, wenn man die Methodik der Modifikationen etwas kritisch betrachtet. Ein Beispiel genüge:

Die jüngst von Noguchi angeführte Modifikation besteht darin, daß die an Filtrierpapier angetrockneten Reagentien vor dem Gebrauche in einem Reagenzglase gelöst werden. Zwei Reagenzröhrchen — eins zur

Serumuntersuchung, eins zur Kontrolle — sollten genügen, als praktischer und billiger Thermostat wird die Westentasche des Untersuchers benutzt. Man kann ohne weiteres sagen, daß diese Vereinfachung bei der Kompliziertheit der Reaktion gewiß nur zu unsicheren Resultaten führen kann und nur dazu geeignet ist, die Sicherheit dieser Reaktion beim Praktiker zu mißkreditieren. Die Versuchsbedingungen sind hier unkontrollierbar, das Serum ist im aktiven Zustande und deshalb, wie später gezeigt werden wird, unbrauchbar, namentlich wenn nur zwei Verdünnungen des Serums hergestellt werden.

Ein Hauptgrund, die Ausführung der Seroreaktion dem Praktiker auf jede Weise möglich zu machen, wäre der, daß er selbst schnell und sicher seine Diagnose abgeben kann; aber dieser Grund fällt weg, da es sich bei der Syphilis mehr um ein chronisches Leiden handelt. Es wird daher eine Diagnose, die etwas später von einem mit der Technik und Methodik dieser Reaktion geübten und durchaus vertrauten Spezialisten gegeben wird, stets noch zur rechten Zeit kommen und vor allem den Wert der möglichsten Sicherheit besitzen.

Die veröffentlichten Vereinfachungen der Wassermannschen Reaktion veranlaßten uns, mehrere der neuen Modifikationen, die sorgfältig experimentell begründet waren und nicht von vornherein, wie die Arbeit von Noguchi, den Stempel des Unbrauchbaren an der Stirn tragen, in einer größeren Anzahl von Fällen mit der alten Methodik zu vergleichen und auf ihren Wert zu untersuchen.

Vor einiger Zeit veröffentlichten Sachs und Rondoni eine Arbeit, in der sie an Stelle des syphilitischen Leberextraktes ein aus chemischen Stoffen zusammengesetztes Gemisch empfehlen und über die damit erzielten Resultate sehr Günstiges berichten. Sollte sich dieses stets leicht und gleichmäßig herstellbare Gemisch wirklich in der Praxis bewähren, so würde das bei der allbekannten Schwierigkeit, gleichwertige syphilitische Extrakte zu bereiten, eine wesentliche Vereinfachung und Erleichterung für die Serumdiagnostik der Syphilis bedeuten.

Es ist allgemein bekannt, daß gute und brauchbare Extrakte aus syphilitischen Lebern nur selten erhältlich sind. Trotz größter Mühe und Vorsicht ist es oft unmöglich, Extrakte von gleicher Güte und Wertigkeit zu erhalten. Ist man in den Besitz eines brauchbaren Extraktes gelangt, so ist eine genaue und oft wiederholte Kontrolle dieses Extraktes nötig.

Bald nachdem man erkannt hatte, daß das wirksame Agens in dem Leberalkoholextrakt wahrscheinlich eine lipoidartige Substanz sei, ver-

suchten eine Reihe von Autoren, den Leberextrakt durch lipoidähnliche Substanzen zu ersetzen. Es sei hier erinnert an die Arbeiten von Porges und Meier, die Lecithin an Stelle des Leberextraktes nahmen, Levaditi und Yamanouchi, die gallensaure Salze benutzten, an Fleischmann, der Cholestearin und Vaseline verwandte, an Sachs und Altmann, die zu ihren Versuchen Seife und oleinsaures Natrium nahmen.

Es hat sich aber gezeigt, daß alle diese Präparate für die Praxis nicht brauchbar sind; es ergaben sich nirgendwo völlig eindeutige Resultate. Nach unseren eigenen Erfahrungen haben sich die Reaktionen, die mit derartigen Präparaten angestellt wurden, als ganz unsicher erwiesen. Benutzt man große Dosen, so tritt oft Hämolyse bei Verwendung sicher syphilitischer Sera auf, andererseits wirken niedrige Dosen bisweilen allein, ohne Serumzusatz, hemmend; manchmal bilden sich Trübungen und Niederschläge, die sich auch bei größter Erfahrung nicht immer richtig deuten lassen. Es läßt sich wohl schon jetzt sagen, daß diese chemischen Präparate in der Praxis niemals einen vollwertigen Ersatz für den syphilitischen Lebensextrakt geben können.

Da die meisten Forscher mit den einzelnen Substanzen sehr oft schlechte Erfahrungen gemacht hatten, versuchten Sachs und Rondoni durch Benutzung von Gemischen verschiedener Substanzen vorwärts zu kommen.

Sachs und Rondoni benutzten ein Gemisch von oleinsaurem Natrium, Lecithin und Oleinsäure, die in einer bestimmten Quantität Alkohol gelöst werden. Bekanntlich wirkt oleinsaures Natrium, eine Seife, allein hämolytisch. Zur Abschwächung dieser hämolytischen Wirkung wird das Lecithin hinzugefügt. Lecithin schwächt zugleich die antikomplementäre Wirkung des oleinsauren Natriums und Oleinsäure wird zugefügt, um die hämolytische Wirkung des oleinsauren Natriums und des Lecithins zu verstärken. Die Autoren benutzten zwei Gemische, die nur durch die Quantität der gelösten Substanzen sich unterschieden und kontrollieren die Wirkung ihrer Gemische an einer Reihe von syphilitischen und normalen Sera, indem sie gleichzeitig Versuchsreihen mit alkoholischen Leberextrakten anstellten. Auf Grund dieser vergleichenden Untersuchungen kamen sie zu dem Schluß, daß syphilitische Sera, die mit den alkoholischen Leberextrakten Komplementbindung gaben, diese auch mit ihrem künstlichen Gemische gaben, während normale Sera sowohl mit dem künstlichen Gemische wie mit dem Alkoholextrakt negativ reagierten. Sie selbst geben aber am Schluß ihrer Arbeit kein bestimmtes Urteil über die Brauchbarkeit ihres Gemisches für die Praxis und fordern zu weiterer Nachprüfung an Hand von größeren Vergleichsreihen auf.

Wir stellten daher streng nach dem Rezept von Sachs und Rondoni Versuche mit einer Anzahl von Sera an und verglichen die Wirkung der Gemische mit der Wirkung von alkoholischen Extrakten aus syphilitischen Lebern und normalen Meerschweinchenherzen. Die Extrakte waren vorher mehrmals sorgfältig auf ihre Wirksamkeit untersucht worden. Die Extrakte wurden benutzt in fallenden Dosen, dann wurde 0,1 ccm inaktiviertes Serum zugesetzt und hierzu 1 ccm 5 Proz. Meerschweinchenkomplements. Diese Mischung wurde auf eine Stunde in den Brutschrank gebracht und dann 2 ccm hämolytisches System zugefügt, was aus 5 Proz. gewaschenen Hammelblutkörperchen und den darauf passenden Kaninchenambozeptoren in der doppelten Dosis des Titors bestand. Die Resultate wurden nach einer halben, nach einer und nach 24 Stunden abgelesen. Auf Veranlassung von Prof. Kolle, der die folgenden Untersuchungen anregte, benutzten wir Gemische auch in doppelter Konzentration, da wir gleich anfangs beobachteten, daß die Gemische in der Konzentration, wie sie Sachs und Rondoni angeben, nur in hohen Dosen bei syphilitischen Sera hemmend wirken. Gleichzeitig wurde aber auch ein Gemisch in den von beiden Autoren empfohlenen Dosen benutzt.

Versuch am 2. Febr. 1909.

	Serum No. 14				Serum No. 18				Serum luet.				Serum normal			
	Leber-Lues-Extr.	Meerschw.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meerschw.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meerschw.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meerschw.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,0125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Kontrollen in Ordnung.



## Versuch am 4. Febr. 1909.

	Serum No. 35				Serum No. 36				Serum No. 37				Serum luet.			
	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B
0,4			o	o			o	o			o	o			o	o
0,25			o	o			o	o			o	o			o	o
0,2			o	o			o	o			o	o			o	o
0,1			o	o			o	o			o	o			o	o
0,05			o	o			o	o			o	o			o	o
0,02			o	o			o	o			o	o			o	o
0,01			o	o			o	o			o	o			o	o

Kontrollen in Ordnung.

## Versuch am 9. Febr. 1909.

	Serum No. 57				Serum luet.				Serum luet.				Ser. norm.			
	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B
1,0			o	o			o	o			o	o			o	o
0,75			o	o			o	o			o	o			o	o
0,5			o	o			o	o			o	o			o	o
0,4			o	o			o	o			o	o			o	o
0,2			o	o			o	o			o	o			o	o
0,1			o	o			o	o			o	o			o	o
0,05			o	o			o	o			o	o			o	o
0,02			o	o			o	o			o	o			o	o
0,01			o	o			o	o			o	o			o	o

Versuch am 10. Febr. 1909.

	Serum No. 68				Serum No. 71				Serum No. 72			
	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gewicht A	Gemisch B	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B
1,0												
0,75												
0,5												
0,25												
0,1												
0,05	o o o o o	o o o o o	o o o o o o o	o o o o o o o	o + x x x	o o + x x	o o o o o o o	o o o o o o o	o o o o o	o o o o o	o o o o o o o	o o o o o o o
0,02												
0,01												

Versuch am 16. Febr. 1909.

	Serum No. 81						Serumluet.			Serum No. 84					Serumluet.			Serum No. 98				
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					
	Leber-Lues-Extr.																					
	Meerschw.-Herz-Extr.																					
	Gemisch A																					
	Gemisch B																					
	Gem. A in dop. Konz.																					
	Gem. B in dop. Konz.																					

Kontrollen in Ordnung.

Versuch am 19. Febr. 1909.

	Serum No. 2						Serum No. 3						Serum No. 114					
	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Gem. A in dop. Konz.	Gem. B in dop. Konz.	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Gem. A in dop. Konz.	Gem. B in dop. Konz.	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Gem. A in dop. Konz.	Gem. B in dop. Konz.
1,0	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+
0,75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	Serum No. 117						Serum No. 118						Serum Tabes					
	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Gem. A in dop. Konz.	Gem. B in dop. Konz.	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Gem. A in dop. Konz.	Gem. B in dop. Konz.	Leber-Lues-Extr.	Meersch.-Herz-Extr.	Gemisch A	Gemisch B	Gem. A in dop. Konz.	Gem. B in dop. Konz.
1,0	o	o	o	o	o	o	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+
0,75	o	o	o	o	o	o	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+
0,5	o	o	o	o	o	o	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+
0,4	o	o	o	o	o	o	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+
0,2	o	o	o	o	o	o	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+
0,1	o	o	o	o	o	o	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+
0,05	o	o	o	o	o	o	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+
0,02	o	o	o	o	o	o	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+
0,01	o	o	o	o	o	o	o	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+

## Versuch am 25. Febr. und 2. März 1909.

	No. 95 Ser. luet.	No. 96 Ser. luet.	No. 97 Ser. luet.	No. 103 Ser. norm.	No. 103 Ser. norm.	No. 99 Ser. luet.
1,0	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,75	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,5	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,4	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,2	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,1	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,05	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,02	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,01	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX

## Versuch am 3. März 1909.

	Serum No. 12	Serum No. 13	Serum luet.	Serum norm.
1,0	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,75	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,5	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,4	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,2	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,1	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,05	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,02	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX
0,01	o+XX	o+XX	o+XX	o+XX

Aus unseren Tabellen ersieht man, daß das künstliche Gemisch sowohl in der Konzentration, wie Sachs und Rondoni sie angeben, als auch in der doppelten Konzentration nur bei sehr hohen Dosen mit syphilitischen Seris Hemmung gibt. Bei

einer Dosis von 0,2, wo syphilitische Extrakte noch ein deutlich positives Resultat geben, sind diese Gemische meist nicht mehr wirksam. Normalsera ergaben mit den Gemischen niemals Hemmung. Die syphilitischen Sera hemmten alle mit Ausnahme von 3 klinisch sicheren Fällen No. 71, 84 und 95, bei denen sowohl mit syphilitischem Leberextrakt wie auch mit Meerschweinchenherzextrakt die Reaktion deutlich positiv ausfiel. Auch bei Anwendung sehr hoher Dosen des Gemisches ließ sich mit diesen 3 Sera keine Komplementbindung erzielen. Wenig vorteilhaft ist es für die praktische Brauchbarkeit der Gemische, daß eine nachträgliche Lösung der Blutzellen auch dann eintritt, wenn Hemmung durch Komplementbindung nachgewiesen war, eine Erscheinung, die bei Extrakten aus syphilitischen Lebern oder normalen Organen nicht beobachtet wird. Da Sachs und Rondoni mit ihren Gemischen von Lecithin und Seife bei schwach reagierenden syphilitischen Sera nur sehr geringe Reaktionen erhielten, während die gleichen Sera mit alkoholischen Leberextrakten sehr starke Reaktion ergaben, versuchten sie durch Zusatz von Oleinsäure die hämolytische und antikomplementäre Wirkung des Lecithins und oleinsäuren Natriums zu steigern. Doch es scheint, daß sie mit diesem Zusatz nicht eine erheblichere Verbesserung ihres Gemisches erhalten haben. Das negative Resultat mit drei klinisch sicheren syphilitischen Sera fordert nach unserer Meinung zu einer gewissen Vorsicht diesen Gemischen gegenüber auf, und es läßt sich wohl auch hier sagen, daß das Gemisch von Sachs und Rondoni keinen vollwertigen Ersatz für den syphilitischen Extrakt bietet<sup>1)</sup>.

Bisher wird die Frage noch immer diskutiert, ob wässrige oder alkoholische Extrakte wirksamer wären. Wir stellten daher eine Anzahl Versuche an, bei denen wir wässrige und alkoholische Extrakte nebeneinander verwandten.

Ursprünglich benutzte Wassermann wässrige, später aber alkoholische Leberextrakte. Nach Versuchen von Porges und Meier, Landsteiner, Müller und Pötzl erwiesen sich die alkoholischen Extrakte als sicherer wirksam und haltbarer. In der letzten Zeit wies Citron

1) Es sei hier bemerkt, daß Facchini (diese Zeitschrift Bd. 1) unter der Leitung von Prof. Friedberger mit den gleichen Gemischen Versuche angestellt hat und fast zu den gleichen Ergebnissen gelangt ist.

wieder auf die wässerigen Extrakte hin, womit er bessere Resultate als mit alkoholischen Extrakten erzielt hatte; das gleiche berichtet jüngst Lesser. Sie rechtfertigen die Benutzung der wässerigen Extrakte damit, daß bei diesen die nachträgliche Lösung weit geringer als bei alkoholischen Extrakten ist.

Wir benutzten zu unseren Versuchen wässrige Extrakte, die genau nach den Angaben Wassermanns hergestellt waren. Diese ergaben meistens schwächere Hemmungen als die alkoholischen; bei ihnen trat eine Hemmung nur in Dosen von 0,2—0,1 auf, während alkoholische Extrakte mit den gleichen Seris noch in viel geringeren Dosen Hemmung zeigten. Mit der Zeit verlieren die wässerigen Extrakte an Wirksamkeit, und man muß daher öfter ihre Dosen erhöhen, um positive Resultate zu erhalten. Die gleichen Beobachtungen machte auch Seligmann. Wir haben bemerkt, daß die wässerigen Extrakte plötzlich unwirksam werden, wenn man zu den Untersuchungen stets gleichbleibende Dosen benutzt; erhöht man die Dosen, so erhält man wieder gute und sichere Resultate, während wir bei alkoholischen Extrakten immer eine gleichbleibende Wirksamkeit beobachten konnten. Es dürfte sich daher empfehlen, gleichzeitig alkoholische neben den wässerigen Extrakten zu benutzen, um einmal bei den alkoholischen Extrakten den Fehler der Nachlösung und gleichzeitig bei den wässerigen Extrakten den Nachteil des plötzlichen Unwirksamwerdens auszuschalten. Die Beobachtung von Citron, daß wässrige Extrakte an verschiedenen Orten verschieden wirksam waren, dürfte wohl weniger durch Verschiedenheit in der Technik als durch Veränderung der Wirksamkeit der Extrakte erklärt werden. Es ist also nicht zu empfehlen, völlig den Resultaten, die man bei Anwendung wässriger Extrakte erhält, zu vertrauen.

Wenn man die verschiedenen neueren Arbeiten über die Serodiagnostik bei Syphilis verfolgt, so sieht man, wie eine Anzahl Autoren bestrebt war, die Reaktion dadurch zu vereinfachen, daß sie den künstlichen hämolytischen Ambozeptor und das Meerschweinchenkomplement durch die natürlichen Ambozeptoren und Komplemente, die im menschlichen Serum enthalten sind, zu ersetzen. Hier müssen besonders genannt werden Bauer, Hecht, Tschernogubow und Stern. Die zwei ersten behaupten, daß die Benutzung eines künstlichen, durch Immunisierung mit Hammelblutkörperchen bei Kaninchen hergestellten hämolytischen Serums sehr unzuverlässig sei, und zudem überflüssig, ja oft sogar schädlich sei, da Kaninchenimmunblut für sich allein, ohne Komplement zu binden, Hämolyse her-

vorrufen könne und so das Phänomen der Hemmung bei sicher syphilitischen Sera verdecke. Hecht ist in dieser Beziehung etwas vorsichtiger. Hat er einige Zeit nach der Vermischung der Flüssigkeiten keine Hämolyse bekommen, so setzt er noch eine gewisse Quantität (0,05—0,1 ccm) frisches menschliches Normalserum hinzu, um Hämolyse hervorzurufen, wenn in seinen Kontrollröhrchen die 2-proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung nicht gelöst worden ist.

Wir wollen weiter auf die Einzelheiten dieser Methodik, die wir für eine den Fehlerquellen Tür und Tor öffnende und keineswegs die Technik vereinfachende halten, nicht eingehen, sondern nur kurz unsere eigenen Untersuchungen, die wir mit Zusatz natürlicher Ambozeptoren ausgeführt haben, mitteilen. Es hat sich bei unseren Versuchen gezeigt, daß der Gehalt an natürlichen Ambozeptoren in menschlichen Seris sehr wechselnd ist. Die Ursachen dieses wechselnden Gehaltes kennen wir bis jetzt noch nicht. Sie mögen angeboren oder durch veränderten Stoffwechsel begründet sein, oder durch Krankheiten, welche die einzelnen Menschen durchgemacht haben. Es ist ja auch bekannt, daß bei verschiedenen Kaninchen, die man ganz gleichmäßig mit artfremden Blutkörperchen behandelt, der Gehalt an hämolytischen Immunambozeptoren ein sehr wechselnder ist. Da wir aber das Kaninchenserum genau auf seinen hämolytischen Titer einstellen können, so ist es sicher, daß bei Anwendung dieses künstlichen Ambozeptors die Fehler weit geringer sein werden. Wenn natürliche hämolytische Ambozeptoren in zu geringem Maße in Menschenserum vorhanden sind, ist es nach Hechts Ansicht nötig, nochmals frisches Serum zuzusetzen. Weil dieses sehr oft nicht immer vorrätig zu halten ist, bedeutet diese Methode eher eine Erschwerung als eine Vereinfachung der Reaktion. Wir haben bei unseren Prüfungen sogar, trotz zweimaligem Zusatz frischen Serums, keine unseren mit der bewährten Methodik des künstlich hämolytischen Systems angestellten Kontrollversuchen entsprechenden Resultate erhalten. Selbst wenn also die notwendige Titrierung der menschlichen Sera auf natürliche Ambozeptoren vor der Prüfung derselben im Komplementbindungsversuch jedesmal ausgeführt würde, damit eine vergleichbare Methodik zustande kommt, muß die Sicherheit des Erfolges zweifelhaft sein, weil wir nicht wissen, inwieweit die natürlichen Ambozeptoren nicht auch durch die komplementverankernden Stoffe gebunden werden.

Von Arbeiten, die den Versuch machten, das Meer-schweinchenkomplement durch das im Prüfungsserum vorhandene zu ersetzen, seien diejenigen von Tschernogubow, Hecht und Stern genannt. Wir haben hauptsächlich nach den Angaben der letzteren Versuche angestellt. Stern vertritt hierbei die Ansicht, daß der Komplementgehalt des menschlichen Serums nur geringe Schwankungen aufweist und sich ziemlich lange bei der Aufbewahrung der Sera erhält, jedenfalls 48 Stunden lang annähernd gleich. Ein Vorteil soll es sein, daß die Hämolyse bei derartigen komplementhaltigen Seris schneller auftritt als bei inaktivierten.

Unsere Versuche, die sich streng nach der Sternschen Methodik richteten, haben uns gezeigt, daß der Komplementgehalt der meisten Sera nach 2—3 Tagen für die Komplementbindungsversuche, wie sie angestellt werden müssen, nicht mehr ausreichend ist. Wenn man aktive Sera auf ihren Komplementgehalt austitriert bei Verwendung verschiedener hämolytischer Ambozeptoren von wechselndem Titer und Zusatz von 2- oder 2,5-proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung, so ergab sich, das 2—3—4-tägige Sera oft keine genügende Dosis Komplement mehr enthalten, wie sie für eine komplette Lösung nötig ist. Frische Sera besitzen bisweilen einen Komplementgehalt, der nur genügt, je 1 ccm 2-proz. Hammelblutaufschwemmung, bei Zusatz der verschiedenen Serumverdünnungen, zur Hämolyse zu bringen. Oft sogar hemmen normale Sera die Hämolyse, da in diesen Seris überhaupt keine Komplemente vorhanden sind. Diese Beobachtungen führen zu dem Schluß, daß diese Methodik nicht für die Praxis reif ist.

## Alkoholischer Leberextrakt.

	Ser. 43	Ser. 44	Ser. 45	Ser. Ka.	Ser. Al.	Ser. Ga.	Ser. Pr.	Ser. 47	Ser. 38	Ser. 42	Ser. 46	Ser. 49	Ser. 54	Ser. 55	Ser. 57	Ser. 58	Ser. 62	Ser. 63	Ser. 64	Ser. 66	Ser. 67	Ser. 68	Ser. 69	Ser. 70
Im inaktiven Zustande (mit Komplementzusatz).																								
0,2	×	×	0	0	0	0	0	0	0	×	×	0	0	0	0	0	0	×	0	×	×	×	×	0
0,1	×	×	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	×	0	×	×	×	×	0
0,05	+	×	0	0	0	0	0	0	0	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	+	0	+	+	+	+	0
0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	⊙	⊙	⊙	⊙	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



	Ser. 43	Ser. 44	Ser. 45	Ser. Ka.	Ser. Al.	Ser. Ga.	Ser. Pr.	Ser. 47	Ser. 38	Ser. 42	Ser. 46	Ser. 49	Ser. 54	Ser. 55	Ser. 57	Ser. 58	Ser. 62	Ser. 63	Ser. 64	Ser. 66	Ser. 67	Ser. 68	Ser. 69	Ser. 70
Im aktiven Zustande (mit Komplementzusatz).																								
0,2	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
0,1	×	×	×	×	×	×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05	×	×	×	×	×	×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,02	×	×	×	×	×	×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,01	×	×	×	×	×	×	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## Alkoholischer Leberextrakt.

	Ser. 70	Ser. 71	Ser. 72	Ser. 73	Ser. 74	Ser. 75	Ser. 77	Ser. 78	Ser. 79	Ser. 80	Ser. 81	Ser. 82	Ser. 84	Ser. 85	Ser. 86	Ser. 87	Ser. 88	Ser. 89	Ser. 89a	Ser. 90	Ser. 91	Ser. 92	Ser. 93	Ser. 94
Im inaktiven Zustande.																								
0,2	0	0	0	0	×	0	0	×	×	0	×	0	0	×	0	×	0	×	×	×	×	0	×	0
0,1	0	0	0	0	+	0	0	+	×	0	×	0	0	+	0	×	0	+	+	+	+	0	+	0
0,05	0	0	0	0	+	0	0	+	×	0	×	0	0	+	0	×	0	+	+	+	+	0	+	0
0,02	0	0	0	0	+	0	0	+	×	0	×	0	0	+	0	×	0	+	+	+	+	0	+	0
0,01	0	0	0	0	+	0	0	+	×	0	×	0	0	+	0	×	0	+	+	+	+	0	+	0

## Im aktiven Zustande.

	Ser. 70	Ser. 71	Ser. 72	Ser. 73	Ser. 74	Ser. 75	Ser. 77	Ser. 78	Ser. 79	Ser. 80	Ser. 81	Ser. 82	Ser. 84	Ser. 85	Ser. 86	Ser. 87	Ser. 88	Ser. 89	Ser. 89a	Ser. 90	Ser. 91	Ser. 92	Ser. 93	Ser. 94
0,2	×	×	+	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	0
0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
0,05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
0,02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0

## Alkoholischer Leberextrakt.

	Ser. 95	Ser. 96	Ser. B.	Ser. G.	Ser. T.	Ser. 97	Ser. 98	Ser. 101	Ser. 102	Ser. 103	Ser. 105	Ser. 107
Im inaktiven Zustande.												
0,2	×	0	0	0	0	×	0	0	×	0	0	0
0,1	+	0	0	0	0	+	0	0	×	0	0	0
0,05	+	0	0	0	0	+	0	0	×	0	0	0
0,02	+	0	0	0	0	+	0	0	×	0	0	0
0,01	+	0	0	0	0	+	0	0	×	0	0	0
Im aktiven Zustande.												
0,2	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Die praktische Unbrauchbarkeit der Methodik ergibt sich aber aus der Tatsache, daß aktive, d. h. nicht durch Erhitzen ihres Komplementes beraubte Sera allein bei der Reaktion hemmend einwirken.

Wir haben weiterhin Untersuchungen angestellt mit aktiven Seris, die so lange auf Eis aufbewahrt wurden, bis das Komplement zugrunde gegangen, bei Zusatz des gewöhnlichen Meerschweinchenkomplementes (1 ccm von 5-proz. Lösung). Wir gingen dabei von dem Gedanken aus, daß derartige vorbehandelte Sera vielleicht brauchbarer wären als inaktive Sera, da vielleicht durch die Erhitzung im Serum irgendwelche, die Reaktion ungünstig beeinflussende Stoffe frei gemacht und die komplementverankernden Stoffe geschädigt werden könnten. Wir haben gleichzeitig zur Kontrolle dieselben Sera, die durch Erhitzung auf 56° eine halbe Stunde inaktiviert worden waren, untersucht. Auf diese Weise haben wir 60 Sera sowohl syphilitischer wie nicht-syphilitischer Herkunft geprüft. Es hat sich erwiesen, daß sehr oft normale Sera in aktivem Zustande (d. h. mehrere Tage auf Eis gelagert) bei Zusatz 5-proz. Meerschweinchenkomplementes Hemmung der Hämolyse bei solchen Dosen zeigten, bei denen nach Erhitzung auf 56° nur sicher syphilitische Sera hemmend wirken<sup>1)</sup>.

Aus unseren Untersuchungen läßt sich schließen, daß der Prozeß der Inaktivierung der Sera durch Erhitzen auf 56° nicht nur unschädlich, sondern sogar absolut notwendig ist, um diejenigen mit der Syphilisinfektion in keinem Zusammenhang stehenden, in manchen von gesunden Personen gewonnenen Seren vorkommenden Körper, die hemmend auf die Hämolyse wirken, zu zerstören. Eine Erklärung der Ursache unserer Befunde können wir vorläufig nicht geben. Solange man über die Stoffe in syphilitischem Serum, welche die Reaktion hervorrufen, keine völlige Klarheit besitzt, ist die äußerste Vorsicht geboten, ehe neue Modifikationen der Wassermannschen

1) Dieselben Beobachtungen bezüglich der besseren Wirksamkeit der aktiven Sera sind von Sachs und Altmann im Jahre 1908 gemacht worden; wir sind dazu unabhängig davon und ohne Kenntnis der betreffenden Mitteilung (Verhandlungen der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, X. Kongreß) gelangt und wurden erst während der Korrektur dieser Arbeit darauf aufmerksam gemacht.

Methodik eingeführt werden. Will man sicher Mißverständnisse vermeiden, so soll man sich streng an die ursprüngliche Methodik halten, die nach unseren Erfahrungen die einzig sichere und zuverlässige für die Diagnose der Syphilis in der Praxis ist.

Für die Theorie, wie man sich das Zustandekommen der komplementverankernden Stoffe bei Syphilitikern erklären soll, und welcher Natur diese Stoffe sind, ist die Tatsache, daß in normalen, nicht durch Erhitzen inaktivierten Sera antikomplementäre Körper vorhanden sind, von entscheidender Bedeutung. Es kann auf diesem Wege vielleicht entschieden werden, ob die antikomplementären Wirkungen des Syphilitikerserums überhaupt auf der Anwesenheit von Antikörpern beruhen.

#### Zusammenfassung.

1) Die von Hecht, Bauer, Tschernogubow, Stern etc. empfohlenen Modifikationen der Wassermann-Neisser-Bruckschen Methodik geben nicht so sichere und eindeutige Resultate, wie die ursprüngliche von Wassermann und Bruck angegebene.

2) Da die Ausführung dieser Reaktion einmal wegen der oft schweren Beschaffung des Materials für den Praktiker schwierig ist und andererseits einen geübten und erfahrenen Untersucher verlangt, ist es unserer Ansicht nach nötig, daß diese Reaktion nur an Zentralstellen gemacht werden soll, da sie dort immer von einem Untersucher, der sich speziell und intensiv mit dieser Reaktion beschäftigen kann, angestellt wird. Nur in diesem Falle ist eine Sicherheit für die Zuverlässigkeit dieser Reaktion vorhanden.

3) Nicht inaktivierte normale menschliche Sera, sowohl komplementhaltige wie komplementfreie, können in denselben Dosen antikomplementär wirken, wie die bei 56° inaktivierten Syphilitikersera.

4) Nicht inaktivierte komplementhaltige oder komplementfreie Syphilitikersera oder seröse Flüssigkeit (Cerebrospinalflüssigkeit) können hämolytisch wirken und das Phänomen der Komplementbindung verdecken, während die eine Stunde lang bei 56° erhitzten gleichen Flüssigkeiten nicht hämolytisch wirken.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte Berlin.]

**Ueber Herstellung und Prüfung von Antipneumokokkenserum und über die Aussichten einer spezifischen Behandlung der Pneumonie.**

Von Prof. **F. Neufeld** und Stabsarzt Dr. **Händel**<sup>1)</sup>.

(Eingegangen bei der Redaktion am 1. Juli 1909.)

Die Möglichkeit der Gewinnung eines Pneumokokkenserums ist schon von Klemperer bewiesen und in der Folge von vielen Autoren: Emmerich, Foà, Washbourn, Pane, Mennes, Kindborg u. a. bestätigt worden. Besonders sind jedoch die umfassenden Untersuchungen Römers zu nennen. Kürzlich hat Heim versucht, durch Verwendung von Organextrakten noch bessere Resultate als mit Serum zu erhalten.

Auch am Menschen ist das Pneumokokkenserum bereits vielfach erprobt worden, so daß schon vor 5 Jahren ein amerikanischer Autor, Anders<sup>2)</sup>, über mehr als 500 Fälle berichten konnte.

Trotzdem herrscht nicht nur über die Möglichkeit der spezifischen Therapie beim Menschen, sondern auch über die wichtigsten Punkte der Pneumokokkenimmunisierung überhaupt keine Einigkeit, insbesondere über die Art der Antikörper, welche eine Rolle dabei spielen, über die Methode der Serumgewinnung, über die Möglichkeit und die Art einer exakten Serumprüfung, schließlich über die Frage der Polyvalenz.

**Art der Pneumokokkenantikörper.**

Was die Wirkungsweise des Serums betrifft, so haben unsere Untersuchungen die früheren Befunde von Neufeld

---

1) Nach einem am 3. Juni d. J. in der „Freien Vereinigung für Mikrobiologie“ in Wien gehaltenen Vortrage. Die ausführliche Publikation der Untersuchungen wird in den „Arbeiten aus dem Kais. Gesundheitsamt“ erfolgen.

2) Journal amer. med. Assoc., 10. Dez. 1904, Bd. 43.

und Rimpau weiterhin bestätigt, und wir glauben diese Wirkung auf spezifische Tropine zurückführen zu können. Allerdings ist noch kürzlich von Römer<sup>1)</sup> das Vorhandensein von Tropinen, d. h. von thermostabilen phagocytosebefördernden Serumstoffen gegen virulente Pneumokokken bestritten worden, doch konnten wir mehrfach mit Römers eigenem Serum eine ausgezeichnete Phagocytose von höchst virulenten Kokken erzielen. Wir glauben, daß Römers Mißerfolg auf einer unzweckmäßigen Technik beruht<sup>2)</sup>.

Diese Fragen sind nicht nur von theoretischem Interesse, vielmehr hat Römer<sup>3)</sup> gerade darauf den größten Wert gelegt, daß ein zur Aktivierung der eingeführten Ambozeptoren passendes Komplement notwendig sei, und hat auch geglaubt, die Mitwirkung eines solchen Komplements sowohl in vitro als auch bei Serumprüfungen an Mäusen nachweisen zu können, ebenso glaubte er im Tierkörper das Phänomen der Komplementablenkung zu beobachten. Wir sind überzeugt, daß die betreffenden Versuche Römers auch eine andere Deutung zulassen. Nach unseren Erfahrungen spielt das Komplement keine Rolle beim Pneumokokkenserum. Wir haben niemals einen Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Immuns serum beobachtet, ebensowenig Erscheinungen, die auf eine Komplementablenkung zu beziehen wären. Es mag sein, obgleich wir und mit uns andere Autoren, wie Hectoen, keine solchen Beobachtungen gemacht haben, daß in manchen Serumproben oder vielleicht gegenüber manchen Pneumokokkenstämmen das unverdünnte Serum, wie das von Kruse und Pansini<sup>4)</sup> und von Römer<sup>5)</sup> beschrieben worden ist, eine gewisse entwicklungshemmende Wirkung zeigt, eine erhebliche Bedeutung dürfte derselben bei der Wirkung des Serums im Tierkörper jedoch nicht zukommen.

1) Verh. d. Ophthalmol. Gesellsch., Heidelberg 1907, p. 28.

2) Es ist unbedingt notwendig, nicht nur konzentriertes Serum, sondern eine Reihe abgestufter Verdünnungen zum Phagocytoseversuch zu verwenden, ferner muß man, wenigstens bei Benutzung der von Neufeld und Hüne angegebenen Versuchstechnik, die Röhrchen  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden im Brutschrank halten.

3) Arch. f. Ophthalmologie, Bd. 54, 1902.

4) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 11, p. 279.

5) a. a. O.

Gegen diese Anschauung führt Römer an, daß die Heilung von Pneumokokkenaffektionen der Hornhaut nach Applikation von spezifischem Serum ohne nachweisbare Beteiligung von Phagocyten erfolgt. Hiergegen möchten wir einmal geltend machen, daß unsere Anschauung über die Wirkung des Pneumokokkenserums, wie schon mehrfach hervorgehoben wurde, sich zunächst nur auf hochvirulente Kokken bezieht, und daß möglicherweise bei weniger virulenten Kokken, die bei Hornhautgeschwüren zu überwiegen scheinen, andere Immunitätsverhältnisse vorliegen könnten. Vor allem aber ist nach dem Urteil vieler Ophthalmologen der Einfluß des Römerschen Serums auf das Hornhautgeschwür noch durchaus zweifelhaft, so daß es sich, wie übrigens Römer selbst ausdrücklich anerkennt, bei den beschriebenen Heilungsvorgängen sehr wohl um Spontanheilungen handeln kann. Es ist aber doch von vornherein sehr wahrscheinlich, daß die natürliche Heilung eines Pneumokokkengeschwürs der Hornhaut durch einen ganz anderen Mechanismus zustande kommt, wie die natürliche Heilung der Pneumonie oder wie die künstliche Beeinflussung einer Pneumokokkenseptikämie bei unseren Versuchstieren.

#### **Methode der Immunisierung.**

Wir haben zunächst eine Anzahl von Kaninchen nach der von Neufeld<sup>1)</sup> früher angegebenen Methode immunisiert und sind dann zur Immunisierung von Pferden und Eseln übergegangen. Hierbei haben wir dieselben Grundsätze, wie sie dort für die Kaninchenimmunisierung angegeben wurden, befolgt, indem wir einmal ausschließlich höchstvirulente Kulturen verwendeten (und zwar grundsätzlich Bouillonkulturen, die direkt aus dem Tier gezüchtet waren), entsprechend der von Neufeld und Rimpau<sup>2)</sup> des näheren begründeten Anschauung, daß gerade die Tropine gegen Streptokokken und Pneumokokken ein Reaktionsprodukt auf diejenigen Rezeptoren sind, welche die Virulenz dieser Keime bedingen. Wir haben unsere damaligen Resultate, daß man Kaninchen auch mit abgetöteten virulenten, aber nicht mit gänzlich avirulenten Kokken, seien es lebende oder tote, gegen einen virulenten Stamm schützen kann, weiterhin bestätigt, und zwar auch in solchen Fällen, wo wir als avirulenten Stamm eine künstlich abgeschwächte Modifikation des virulenten, zur Nachprüfung benutzten Stammes verwen-

1) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 40, 1902, p. 68 ff.; vergl. auch ebenda Bd. 34, 1900, p. 457 f.

2) Ebenda Bd. 51, 1905, p. 292 ff.

deten. Ferner haben wir auch bei der Immunisierung der großen Tiere ausschließlich die aus frischen Bouillonkulturen ausgeschleuderten Bakterienkörper verwendet und auf die Benutzung von Filtraten und sonstigen Toxinen grundsätzlich verzichtet<sup>1)</sup>. Schließlich haben wir das Prinzip der schnellen Steigerung der Dosen auch an großen Tieren befolgt.

Früher haben wir berichtet, daß bei Kaninchen der Wert des Serums nicht von der Menge des einverleibten Virus, sondern anscheinend ausschließlich von der Stärke der zuletzt durchgemachten Reaktion abhing und daß oft die besten Sera durch Injektion kleiner Dosen erhalten werden können. In diesem Punkte liegen bei Pferden und Eseln die Verhältnisse insofern anders, als für diese Tierarten die Pneumokokken nicht in demselben Sinne wie für Kaninchen hochpathogen sind, indem bei ihnen offenbar eine Vermehrung der eingeführten Kokken wenigstens nicht in annähernd so starkem Maße wie bei Kaninchen stattfindet. Hiermit hängt es wohl zusammen, daß wir bei den genannten größeren Tieren stark wirksame Sera niemals nach Injektion von kleinen, sondern nur von sehr großen Dosen erhalten haben, ferner auch wohl, daß hier zwischen der Verwendung lebenden und toten Materials kein so ausgesprochener Unterschied wie bei Kaninchen sich geltend macht. Wir haben ausschließlich intravenös injiziert und von lebenden Pneumokokken bei Pferden bis zu 1500 ccm, bei Eseln bis zu 3500, von toten Pneumokokken bei Eseln bis zu 9000 ccm gegeben, d. h. jedesmal die aus der angegebenen Kulturmenge einer 24-stündigen Bouillon-

---

1) Dies beruht auf der früher mitgeteilten Beobachtung, daß man Kaninchen gegen sehr hohe Multipla der für Kontrolltiere tödlichen Dosis (in einzelnen Fällen bis gegen über 100 ccm Bouillonkultur, also etwa die 100millionenfach tödliche Dosis) aktiv immunisieren kann, daß aber die hohen Dosen nur dann vertragen werden, wenn man die ausgeschleuderten Kokken, nicht die ganze Bouillonkultur injiziert; andernfalls sterben die gegen die Infektionswirkung gefestigten Tiere an den in der Bouillon enthaltenen Giften.

Da hieraus hervorgeht, daß die etwa in der Bouillon gelösten Giftstoffe für die Immunisierung zum mindesten nicht notwendig sind, so haben wir mit Rücksicht auf die Kosten darauf verzichtet, das Verhalten der großen Versuchstiere gegenüber diesen Giften zu studieren.

kultur<sup>1)</sup> ausgeschleuderten Keime. Pferde zeigten sich erheblich empfindlicher gegen die lebenden Kokken, wie Esel, scheinen aber bessere Sera zu liefern. Die Injektion abgetöteter Kokken haben wir bisher nur an einem Esel versucht; es scheint, daß man auch auf diesem Wege ein wirksames Serum erhalten kann, wenn es uns auch bisher nicht gelang, einen solchen Titer zu erreichen, wie mit lebender Kultur. Sollte sich die Hoffnung, auf diesem Wege hochwertige Sera zu gewinnen, weiterhin bestätigen, so würden wir diese Methode (intravenöse Injektion der abzentrifugierten, bei 60° abgetöteten Kokken aus hochvirulenten Kulturen) vorziehen, da man mit den Dosen recht schnell steigen kann (wir gaben nacheinander die Dosen 200—600—1200—1800—2500—4000—6000—9000 ccm) ohne die Tiere so zu gefährden, wie es bei Injektion größerer Mengen lebender Kultur der Fall ist. Begreiflicherweise entstehen technische Schwierigkeiten beim Zentrifugieren so großer Dosen, und eine erhebliche Steigerung derselben würde für die meisten Laboratorien sich schwer ermöglichen lassen; wenigstens brauchten wir zum Ausschleudern der genannten Menge auf unserer Zentrifuge bereits mehr als einen halben Tag. Es ist uns bisher nicht gelungen, etwa durch chemische Mittel, welche eine Zusammenballung der Kokken bewirken, oder durch Zusätze zum Nährboden, welche ein üppigeres Wachstum bewirken, diese technischen Schwierigkeiten zu vermeiden.

#### Methode der Serumprüfung.

Eine exakte Methode zur Serumprüfung scheint uns eine unbedingte Notwendigkeit für die Möglichkeit einer praktischen Anwendung des Serums zu sein. Die Statistiken über die Serumwirkung, z. B. auch die jüngst über das Römersche Serum von May<sup>2)</sup> publizierte große Statistik lassen sich für die Beurteilung der Heilwirkung desselben kaum verwenden, da keinerlei Angabe über den Titer des Serums vorliegt. Nun

---

1) Um gleichmäßiges Wachstum und konstante Virulenz der Kulturen zu sichern, wurde ausschließlich Bouillon mit Zusatz von etwa 5 Proz. Rinderserum benutzt.

2) Münch. med. Wochenschr. 1908, No. 40/41.



hat man öfters ähnlich wie bei Streptokokken eine Prüfung des Serums im Tierversuch für unmöglich erklärt, da zwischen der Pathogenität der Pneumokokken für Menschen und Tiere eine völlige Verschiedenheit bestände. So wird noch in den Prospekten des Merckschen nach Römers Angabe hergestellten Serums angegeben, daß die Prüfung am Menschen erfolgt sei, da eine Prüfung an Versuchstieren unmöglich sei. Ueber die Art und Weise, wie diese Prüfung am Menschen ausgeführt wird, wird jedoch nichts mitgeteilt.

Wir können uns dieser Ansicht nicht anschließen, glauben vielmehr nach unseren Erfahrungen, daß die von menschlichen Erkrankungen stammenden Pneumokokken (ebenso wie übrigens die Streptokokken) in der Regel eine sehr hohe Virulenz für Kaninchen, vor allem aber für die von uns zur Prüfung benutzten Mäuse besitzen. Es kommt daher unserer Ansicht nach sowohl bei der Immunisierung als auch für die Serumprüfung nur auf eine Erhaltung, nicht auf eine Steigerung dieser Virulenz an. Zur Erhaltung der Virulenz ist bekanntlich von Heim<sup>1)</sup> für zahlreiche Bakterienarten, die Aufbewahrung mit Blut oder Gewebssaft von infizierten Tieren getränkter Seidenfäden im Exsikkator empfohlen worden. Wir sind in ähnlicher Weise vorgegangen, indem wir — was nach unseren Erfahrungen zweckmäßiger ist — Blut oder Organstücke der an Pneumokokken eingegangenen Tiere in dicker Schicht im Exsikkator antrockneten — ein Verfahren, das übrigens von dem einen von uns (Neufeld) unabhängig von Heim seit mehr als 12 Jahren an sehr zahlreichen Stämmen von Pneumo- und Streptokokken erprobt worden ist und uns eine zuverlässige Konservierung und Virulenzerhaltung für mehrere Monate und sogar für über ein Jahr ermöglicht hat. Das trockene Material wird einfach im Mörser verrieben und einer Maus (oder einem Kaninchen) injiziert; die aus dem Blut dieses Tieres angelegte Bouillonkultur besitzt sofort die ursprüngliche Virulenz des konservierten Stammes.

Von der Mehrzahl der früheren Autoren ist das Serum in der Weise geprüft worden, daß eine kleine Infektionsdosis, etwa die zehn- bis hundertfache Dosis letalis, injiziert wurde;

1) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 50, p. 123.

auch die von Landmann<sup>1)</sup> kürzlich empfohlene Methode, die sich im wesentlichen an die von Aronson für Streptokokkenserum benutzte anschließt, beruht darauf, kleine Infektionsdosen zu wählen und die Serummenge abzustufen. Wir haben bei unseren Versuchen es umgekehrt als zweckmäßiger erprobt, eine größere Serumdosis, z. B. 0,2 ccm, Mäusen intraperitoneal zu geben und 3 Stunden später ebenfalls intraperitoneal steigende Mengen der Kultur. Wir ziehen diese Methode wegen der weit konstanteren Resultate vor. Beinahe ebenso gute Resultate erhielten wir übrigens, wenn wir das Serum subkutan und die Kultur 24 Stunden später intraperitoneal einspritzten.

Gute Serumproben, wie wir sie selbst von Eseln und Pferden hergestellt und wie wir sie auch von Merck bezogen haben, schützen bei dieser Versuchsanordnung gegen 0,1 ccm hochvirulenter Kultur, also die 100 000- bis 1 000 000-fache tödliche Dosis. Bei gleichzeitiger Benutzung eines Standard-Serums glauben wir, daß man bei dieser Methode durchaus zuverlässige und gleichmäßige Resultate erhalten kann, insbesondere wenn man, wie wir empfehlen, dabei stets doppelte Reihen ansetzt. Was den Einfluß normalen Serums betrifft, so hatte bei der genannten Versuchsanordnung das Normalserum von Kaninchen, Pferden und Eseln keinerlei Schutzwirkung, ebensowenig schützten einige Menschensera, dagegen fanden wir bei einigen anderen Serumproben von Menschen, von denen uns wenigstens nicht bekannt war, daß sie einmal eine Pneumokokkeninfektion gehabt hatten, eine gewisse Schutzwirkung.

Bei noch hochwertigeren Sera würden wir empfehlen, etwas unter die genannte Serumdosis herunterzugehen. Gingen wir jedoch bei unseren Proben um das Hundertfache und mehr herunter, so konnten wir zunächst feststellen, daß das Gesetz der Multipla für unser Serum absolut nicht gilt. Wir erhielten ferner bei so kleinen Serumdosen sowie bei den Versuchen, wo wir umgekehrt eine konstante kleine Kulturdosis und abgestufte Mengen von Serum gaben, sehr unregelmäßige Reihen.

---

1) Deutsche med. Wochenschr. 1908, No. 48.

Unsere Serumproben wirkten, wie das auch von früheren Autoren gefunden worden ist, nicht nur schützend, sondern besaßen auch eine beträchtliche kurative Wirkung.

#### **Zur Frage der Polyvalenz.**

Bevor man die Möglichkeit einer therapeutischen Anwendung des Pneumokokkenserums erörtert, muß man auf die Frage der Polyvalenz eingehen. Hier finden wir nun fast von Beginn der einschlägigen Untersuchungen an die divergentesten Ansichten vertreten; manche Autoren stehen auf dem Standpunkt, daß ein mit einem Stamme erhaltenes Serum auch gegen alle anderen Stämme schützt, während andere, und mit ihnen Römer, ein polyvalentes Serum für nötig erklären. Soweit uns bekannt, hat Römer allerdings Genaueres über die Versuche, die ihn zu dieser Ansicht geführt haben, nicht veröffentlicht. Auf dem extremsten Standpunkt steht in dieser Frage Kindborg<sup>1)</sup> in einer aus Fränkels Institut hervorgegangenen Arbeit. Nach den Erfahrungen dieses Autors ist ein Serum nur dann wirksam, wenn die Prüfung mit demselben Stamm erfolgt, der zur Immunisierung gedient hat; jedem anderen Stamme gegenüber soll es ebenso unwirksam, wie Normalserum sein.

Bekanntlich sind die gleichen Fragen für das Streptokokkenserum jahrelang erörtert worden, ohne daß eine völlige Einigung erzielt worden ist; in beiden Fällen ist ferner die Ansicht vertreten worden, daß durch Tierpassagen eine grundsätzliche Aenderung der Stämme in ihrem immunisatorischen Verhalten bewirkt wird — ein Umstand, der natürlich ebenfalls von der größten prinzipiellen Bedeutung für die ganze Frage sein würde.

Unsere Versuche ergaben folgendes: Bei der Verwendung eines univalenten mit einem Stamme hergestellten hochwertigen Serums sowie des Serums von einigen Pneumonie-Rekonvaleszenten ergab sich ein Schutz nicht nur gegen den homologen Stamm, sondern auch gegen eine Reihe von anderen Stämmen, und zwar war dieser Schutz quantitativ nicht wesentlich geringer. Wir haben ferner dabei keinen Einfluß der

1) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 51, p. 197.

Tierpassagen feststellen können. In der Regel waren die Stämme 1—2mal durch die Maus passiert, wenn sie zum erstenmal geprüft wurden; in einzelnen Fällen wurde die Kultur ohne Mäusepassage gezüchtet.

Nachdem wir so an einer Reihe von Kulturen gleichmäßige Resultate erhalten hatten, waren wir überrascht, bei zwei aus Pneumoniefällen, die übrigens klinisch nichts Besonderes boten, isolierten Kulturen überhaupt keinen Einfluß unseres Serums zu bemerken. Die Versuche wurden mit hochwertigem Serum mehrfach wiederholt. Nun versuchten wir anstatt unseres univalenten Römers polyvalentes Serum. Auch hier fanden wir keinerlei Schutzwirkung. Wir machten nun mit einem derartigen Stamm, den wir vorläufig als serumfest bezeichnen möchten, sechs Mäusepassagen und prüften wiederum; auch jetzt ergab sich keine Schutzwirkung des Serums. Ebenso wenig schützten einige sonst wirksame Proben menschlichen Rekonvaleszenten-serums. Dabei waren diese Stämme nicht virulenter, sondern der eine sogar eher etwas weniger virulent für Mäuse, wie der gewöhnlich von uns benutzte Stamm I.

Natürlich haben wir begonnen, mit diesen Stämmen Tiere zu immunisieren, doch verfügen wir noch über kein wirksames Serum. Wir würden es daher für möglich halten, daß es sich hier um serumfeste Stämme im strengen Sinne des Wortes handelte, wenn wir nicht Gelegenheit gehabt hätten, das Serum eines Patienten, von dem der eine der serumfesten Stämme herrührte, nach der Krisis zu untersuchen.

Es ergab sich, daß dieses Serum sowohl gegen den eigenen Stamm als auch gegen den zweiten serumfesten einen ziemlich guten Schutz gewährte, dagegen nicht gegen den zur Immunisierung unserer Versuchstiere von uns benutzten Stamm.

Die Untersuchungen hierüber sind noch nicht abgeschlossen, und wir können noch nicht sagen, wie häufig solche Stämme vorkommen mögen und ebenso wenig, ob sich alle Pneumokokkenstämme auf diese zwei Typen zurückführen lassen<sup>1)</sup>.

1) In den letzten Tagen haben wir noch einen dritten Stamm gefunden, der gegen unser Serum „fest“ ist. Diesen 3 Stämmen stehen etwa 15, die auf das Serum reagieren, gegenüber.

Ein polyvalentes Serum in der Weise herzustellen, daß man wahllos mit einer Reihe beliebiger Stämme abwechselt, erscheint uns nach unseren Versuchen jedenfalls nicht gerechtfertigt.

#### Haltbarkeit des Serums.

Auch über die Haltbarkeit des Serums sind die Anschauungen geteilt, und von einigen Autoren ist gerade das Pneumokokkenserum als außerordentlich labil bezeichnet worden. Nach unseren Untersuchungen hat die Erhitzung auf 59° keinen schädigenden Einfluß auf das Serum, ebenso wenig ein Karbolzusatz. Auch fanden wir, daß das Serum viele Monate lang völlig unverändert haltbar ist.

#### Aussichten für die therapeutische Anwendung bei Pneumoniefällen.

In Bestätigung der früheren Angaben von Klemperer, Neufeld, Römer u. a. fanden wir, daß das Serum von Pneumonierekonvaleszenten in der Regel, wenn auch nicht ausnahmslos und wenn auch in wechselnder Menge, dieselben Schutzkörper enthält, wie unsere Tiersera. In dieser Beziehung besteht ein, wohl bisher nicht genügend beachteter Gegensatz zu den Streptokokkenkrankheiten. Bei Menschen, welche Erysipel oder septische Streptokokkenkrankheiten überstanden hatten, sind überhaupt niemals mit Sicherheit Antikörper nachgewiesen worden. Nach eigenen ziemlich zahlreichen Untersuchungen<sup>1)</sup> fanden sich solche auch nicht gegenüber dem homologen Stamme und auch dann nicht, wenn das Serum kurz nach dem Temperaturabfall entnommen wurde. Sicherlich wäre es erwünscht, wenn diese Untersuchungen fortgesetzt würden. Bisher scheint es jedoch, daß sich den Streptokokken gegenüber die Menschen anders verhalten als unsere Versuchstiere, bei welchen letzteren wir durchaus identische Antikörper wie nach Behandlung mit Pneumokokken finden.

---

1) Neufeld, Deutsche med. Wochenschr., 1897, p. 162; Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 44, p. 167.

Dieses Vorkommen von Antikörpern, wie sie unseren im Tierexperiment erzeugten entsprechen, bei Pneumonie-Rekonvaleszenten glauben wir als ein günstiges Zeichen für die Möglichkeit der therapeutischen Verwendung unseres Serums ansehen zu dürfen, und wir vermuten, **daß für die Praxis alles davon abhängen wird, ob es gelingt, ein genügend hochwertiges Serum zu gewinnen.** Bekanntlich ist von R. Pfeiffer mehrfach die Anschauung vertreten worden, daß dieses auch für die Verwertung der bakteriziden Sera beim Menschen der springende Punkt sei, und daß, wenn mit solchen Seris bisher keine sicheren therapeutischen Resultate gewonnen werden konnten, dies vielleicht ausschließlich dem zu geringen Werte der Sera zuzuschreiben sein kann.

Bei den bakteriotropen Sera ist es auch in vitro evident, daß von einer bestimmten Verdünnung an jeder Effekt des Serums aufhört. Einen direkten Schluß jedoch, wie hochwertig ein Serum sein müßte, um Aussicht für therapeutische Verwendung am Menschen zu bieten, können wir bisher weder aus Reagenzglasversuchen, noch aus Tierversuchen (etwa durch Umrechnen der Dosen auf das Körpergewicht) ziehen, sondern hierüber kann uns nur der Versuch in der Praxis Auskunft geben. Wir möchten jedoch glauben, daß die Aussicht, die nötige Konzentration der Antikörper im Blut überhaupt zu erreichen, bei subkutaner Anwendung des Serums recht gering sein dürfte, besonders aber die Aussicht, diese Konzentration so schnell zu erreichen, wie es für eine Heilwirkung nötig wäre. **Wir halten es daher für notwendig, die Frage der Wirksamkeit des Serums durch intravenöse Injektion größerer Dosen eines exakt ausgewerteten Serums zu entscheiden.**

Obwohl es uns zweifelhaft erscheint, inwieweit die bisher beim Menschen beobachteten „Serumkrankheiten“ sich mit der Anaphylaxie der mit Pferdeserum sensibilisierten Meerschweinchen vergleichen lassen, und obwohl bereits Pestserum in großen Dosen, sowie neuerdings, besonders in England und Amerika, Diphtherieserum ohne jeden Schaden intravenös injiziert worden ist, so möchten wir doch, bis noch weitere Erfahrungen gesammelt sind, bei der Anwendung des Pneumokokkenserums gewisse Vorsichtsmaß-

regeln empfehlen. Zunächst würden wir abraten, solche Personen, die einmal, wenn auch vor Jahren, mit Diphtherie- (oder anderem Pferde-)serum gespritzt worden sind, intravenös zu injizieren. Ferner erscheint es uns vorläufig zweckmäßig, zuerst eine subkutane und erst einige Stunden danach die intravenöse Injektion zu machen.

Neufeld und Wedemann haben bei Meerschweinchen, die künstlich gegen Pferdeserum überempfindlich gemacht waren, so daß sie nach intravenöser Injektion von  $\frac{1}{90}$  ccm Serum mit Sicherheit sofort starben, festgestellt, daß die Tiere die intravenöse Injektion reaktionslos vertrugen, sobald sie mehrere Stunden vorher eine kleine, unschädliche Menge subkutan erhalten haben. Wir benutzten zur subkutanen Vorbehandlung Dosen von 0,1—3,0 ccm Pferdeserum, zur Nachprüfung intraperitoneale Injektion von 5,0, und intravenöse von  $\frac{1}{90}$  ccm. Die kleineren Dosen schützten dabei nicht zuverlässig; das kleinste Intervall, in welchem uns ein Schutz gelang, war 3 Stunden. Die Tiere waren, wie die Kontrollen zeigten, hochgradig überempfindlich. Die Versuche werden alsbald an anderer Stelle mitgeteilt werden. Inzwischen ist übrigens von Besredka (C. r. soc. biol., 1909, p. 125) mitgeteilt worden, daß es ihm gelungen ist, durch intraperitoneale Vorbehandlung anaphylaktische Meerschweinchen gegen eine sicher tödliche, 5 Stunden oder später ausgeführte intracerebrale Injektion zu schützen.

Wenn es auch, wie erwähnt, zweifelhaft ist, ob die bei manchen Menschen bestehende Idiosynkrasie gegen Serum auf einem ähnlichen Mechanismus beruht, wie die künstlich erzeugte Anaphylaxie der Meerschweinchen, so scheint es uns doch bis auf weiteres — insbesondere mit Rücksicht darauf, daß sich die Serumtherapie bei Pneumonie noch durchaus im Versuchsstadium befindet — ratsam, vorsichtshalber der intravenösen Injektion unseres Serums eine subkutane vorausgehen zu lassen.

Falls sich ein günstiger Einfluß des Serums bei einer Reihe von Fällen ergibt, so würde ferner nach dem oben Gesagten zu versuchen sein, ausgewählte Stämme, die sich in immunisatorischer Beziehung abweichend verhalten, zur Behandlung der Serumtiere mitheranzuziehen. Zunächst ist es wohl am rationellsten, eine Anzahl von Pneumoniekranken, insbesondere von alten Leuten, von Alkoholikern oder von sonstigen Fällen, die eine schlechte Prognose bieten, im Beginne der Krankheit mit größeren Mengen Serum intravenös zu injizieren und dann den Einfluß des Serums auf die Temperatur und den Krankheitsverlauf zu beobachten<sup>1)</sup>. Dabei

1) Herr Professor Dr. Brandenburg hat die Freundlichkeit gehabt, derartige Versuche mit unserem Serum in der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses in Groß-Lichterfelde zu beginnen.

müssen aus dem Sputum der mit Serum behandelten Fälle jedesmal die Pneumokokken gezüchtet und daraufhin untersucht werden, ob sie im Tierversuch auf das betreffende Serum reagieren. Dann wird sich wohl bald die Frage entscheiden lassen, ob von dem Pneumokokkenserum für die Therapie etwas zu hoffen ist oder ob wir unsere Versuche so lange aufgeben müssen, bis es etwa gelungen ist, den Titer unserer Sera ganz erheblich zu steigern.

### Zusammenfassung.

Angabe einer Methode zur Gewinnung eines Antipneumokokken-Serums von Pferden und Eseln durch intravenöse Injektionen großer Mengen aus flüssigen Kulturen höchst virulenter Pneumokokken ausgeschleuderter Bakterienkörper.

Beschreibung einer Methode der Serumprüfung an Mäusen unter Anwendung einer konstanten größeren Serumdosis (z. B. 0,2 ccm) mit nachfolgenden Injektionen fallender Mengen hochvirulenter Kultur.

Ein mit einem Pneumokokken-Stamm hergestelltes hochwertiges Serum schützte gegen die meisten anderen Stämme, während eine kleine Minderzahl von Stämmen sich gegen dieses, aber auch gegen ein im Handel befindliches polyvalentes Serum völlig „fest“ erwies.

Zur Entscheidung, ob das Pneumokokken-Serum auch für eine erfolgreiche therapeutische Verwendung beim Menschen hochwertig genug ist, wird vorgeschlagen, eine Anzahl schwerer Pneumoniefälle mit größeren Dosen eines exakt ausgewerteten Serums intravenös zu injizieren, dabei wäre jedesmal auch festzustellen, ob die aus dem Sputum gezüchteten Kokken im Tierversuch auf das benutzte Serum reagieren.



*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Hygienischen Institut der deutschen Universität Prag;  
Vorstand: Prof. F. Hueppe.]

### **Der Einfluß des Pneumokokkenaggressins auf die Phagocytose.**

Von Dr. K. Nunokawa (Japan).

(Eingegangen bei der Redaktion am 1. Juli 1909.)

Eine Behinderung der Phagocytose im Reagenzglas durch Aggressin des zugehörigen Bacillus ist zuerst von Weil-Nakayama<sup>1)</sup> bei Subtilis, Weil-Tsuda<sup>2)</sup> bei Dysenterie nachgewiesen worden.

Seither ist die gleiche Behinderung namentlich durch Pane-Lothi<sup>3)</sup> und Bürgers-Hösch<sup>4)</sup> an Dysenteriebacillen bestätigt und studiert worden. Hingegen konnte Zade<sup>5)</sup> bei Pneumokokken keine Phagocytosehemmung erzielen, sobald er ein in besonderer Weise hergestelltes Aggressin benutzte. Er bediente sich dabei der Methode von Rosenow<sup>6)</sup> und Tschistowich-Jurewich<sup>7)</sup>. Ersterer hielt Pneumokokken in Kochsalzlösung 48 Stunden bei 37°, erhitze 1 Stunde auf 60° und zentrifugierte ab, letzterer wusch einfach mehrmals virulente Kokken mit physiologischer Kochsalzlösung.

Bei unseren eigenen Versuchen kam es darauf an, festzustellen, ob natürliches Aggressin, d. h. Exsudat, tödlich infizierter Tiere, das durch Zentrifugieren, eventuell Sterilisieren, bakterienfrei gemacht ist, die Phagocytose hemmt. Die Wirkungen dieses natürlichen Aggressins sind von E. Hoke<sup>8)</sup> zuerst festgestellt und studiert worden.

1) Weil und Nakayama, Berliner klin. Wochenschr., 1906, No. 3.

2) Weil und Tsuda, Ebenda, 1907.

3) Pane und Lothi, Centralbl. f. Bakt., Bd. 43, No. 7 u. 8.

4) Bürgers und Hösch, diese Zeitschrift, 1909, Bd. 2, No. 1.

5) Zade, Ebenda.

6) Rosenow, Journ. of infect. diseases, 1907.

7) Tschistowich und Jurewich, Ann. de l'Inst. Past., 1908, No. 7.

8) E. Hoke, Wiener klin. Wochenschr., Bd. 18, 1905, No. 15.

Zu den Versuchen wurde ein frisch aus Sputum eines akuten Pneumoniefalles gezüchteter *Pneumococcus* verwendet. Er entsprach in seinem morphologischen und kulturellen Verhalten den bekannten Eigenschaften. Er bildete bei der Züchtung auf Serum keine Kapsel. Seine Virulenz für Mäuse und Kaninchen war sehr hoch. Die Tiere starben septikämisch. Im Tiere wurden regelmäßig Kapseln gebildet.

Zu den Phagocytosenversuchen *in vitro* wurden stets Kulturen auf erstarrtem Serum, die in Kochsalzlösung aufgeschwemmt waren, verwendet. Es stellte sich heraus, daß dieser Stamm der Phagocytose sehr bedeutenden Widerstand entgegensetzte; weder in Kochsalzlösung noch in normalem Kaninchen- und Meerschweinchenserum war sie in irgend erheblichem Grade zu beobachten. Erst durch Verwendung von Immunserum gelang es, eine solche zu erzielen. Das Immunserum stammte von Kaninchen, welche nach dem Vorgang von E. Hoke mit sterilem Pneumokokkenaggressin vorbehandelt waren. Das Aggressin wurde stets in der Weise gewonnen, daß ein kleineres Kaninchen eine intrapleurale Injektion von Pneumokokken erhielt, so daß es hierbei innerhalb höchstens 16 Stunden starb. Das Exsudat wurde verwendet, wenn es sehr reich an Pneumokokken und dabei arm an Leukocyten war. Die Menge desselben wechselte zwischen 3—10 ccm. Das Exsudat war trüb, meist etwas dickflüssig, ließ sich aber ohne besondere Schwierigkeit zentrifugieren. Die Sterilisation desselben erfolgte mittels Tuluol und gelang leicht. Für die Phagocytoseversuche wurde das Aggressin teilweise im sterilisierten, teilweise im ganz frischen Zustande, aber nach ausgiebigstem Zentrifugieren, verwendet.

Ein Kaninchen lieferte nach 4-maliger subkutaner Injektion von im ganzen 19 ccm Aggressin ein hochwertiges Immunserum, welches sehr starke bakteriotrope Wirkungen (Neufeld und Rimpau) zeigte.

Tabelle I.

Am 11. Mai: Kaninchen (Körpergewicht 1120 g). 1,0 ccm Pneumokokkenaggressin subkutan; gleichzeitig wurde 0,1 ccm von demselben Aggressin auf die Serumagarplatte gegossen, welche steril blieb. Keine lokale Erscheinung an der betreffenden Stelle nach der Injektion.

- Am 13. Mai: Dasselbe Kaninchen (Körpergewicht 1170 g). 3,0 ccm Pneumokokkenaggressin subkutan, Aggressin steril, keine lokale Erscheinung.
- Am 17. Mai: Dasselbe Kaninchen (Körpergewicht 1260 g). 5,0 ccm Pneumokokkenaggressin subkutan, Aggressin steril, keine lokale Erscheinung.
- Am 21. Mai: Dasselbe Kaninchen (Körpergewicht 1315 g). 10,0 ccm Pneumokokkenaggressin subkutan, Aggressin steril, keine lokale Erscheinung.

Man sieht aus dieser Immunisierungstabelle, daß die Injektion ohne jede allgemeine Schädigung des Tieres im Verlaufe sehr kurzer Zeit erfolgreich durchgeführt werden konnte. Auch lokale Krankheitserscheinungen traten nach der Injektion selbst von 10 ccm Aggressin nicht auf. Dasselbe kann daher als vollkommen unschädlich und giftfrei bezeichnet werden.

Am 1. Juni wurde Blut von diesem immunisierten Kaninchen probeweise entnommen und der Versuch auf folgende Weise angestellt.

Tabelle II.

Kaninchenleukocyten, welche durch intrapleurale Aleuronatinjektion gewonnen und 2mal mit Kochsalzlösung gewaschen waren, wurden in Kochsalzlösung dick aufgeschwemmt. Pneumokokken von einer Serumkultur wurden ebenso in Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

	Leuko- cyten	Pneumo- kokken	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,25 ccm NaCl	+ 3 Tropf.	+ 3 Tropf.	⊖	⊖
0,25 „ norm. Kan.-Ser.	+ 3 „	+ 3 „	⊖	⊖
0,25 „ Aggressin I.S.	+ 3 „	+ 3 „	starke Phagocyt.	sehr starke
0,25 „ Pneum.-Aggr.	+ 3 „	+ 3 „	⊖	⊖

Mit diesem Serum wurden nun Versuche darüber angestellt, ob das Aggressin der Pneumokokken imstande sei, die bakteriotrope Wirkung zu paralysieren. Bekanntlich hat zuerst Weil und Nakayama für Subtilisaggressin, und später Weil und Tsuda für Dysenterieaggressin eine phagocytosehemmende Wirkung der betreffenden Aggressine nachgewiesen, wobei sie normales Serum verwendeten.

Im unseren Falle handelte es sich darum, eine spezifisch bakteriotrope Serumwirkung mittels des zugehörigen Aggressins zu unterdrücken. Ein Erfolg war von vornherein zu erwarten, da ja ein antiaggressives Serum verwendet wurde, welches notwendig in direkte Beziehungen zum Aggressin treten mußte. Es zeigte sich, daß es tatsächlich in mehr

weniger vollkommener Weise gelang, die antiaggressive bakteriotrope Serumwirkung durch Aggressin in vitro zu beeinflussen.

Die Versuche wurden mit Kaninchenleukocyten angestellt, welche durch intrapleurale Aleuronatinjektion gewonnen und durch sorgfältige Waschung mit Kochsalzlösung von Körperflüssigkeit bereift waren. Leukocyten resp. Pneumokokken wurden in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und in der Menge von je 2 Tropfen jedem Reagenzglase zugesetzt.

Tabelle III.

	Leuk.	Pnk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,3 Aggr. I.S. + 0,3 inakt. K.S. + 2 Trpf.	+ 2	+ 2	zieml. starke Phagocytose	starke
0,15 " " + 0,45 " " "	+ 2	+ 2	schwache	zieml. starke
0,3 " " + 0,3 Pk. Aggr.	+ 2	+ 2	θ	vereinzelte
0,15 " " + 0,45 " " "	+ 2	+ 2	θ	θ
0,6 norm. K.S.	+ 2	+ 2	θ	θ
0,6 NaCl	+ 2	+ 2	θ	θ

Tabelle IV.

	Leuk.	Pnk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,3 Aggr. I.S. + 0,3 inakt. K.S. + 2 Trpf.	+ 2	+ 2	starke Phag.	sehr starke
0,15 " " + 0,45 " " "	+ 2	+ 2	zieml. starke	starke
0,3 " " + 0,3 Pk. Aggr.	+ 2	+ 2	vereinzelte	schwache
0,15 " " + 0,45 " " "	+ 2	+ 2	θ	vereinzelte
0,6 norm. K.S.	+ 2	+ 2	θ	θ
0,6 NaCl	+ 2	+ 2	θ	θ

Tabelle V.

	Leuk.	Pnk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,1 Aggr. I.S. + 0,3 inakt. K.S. + 2 Trpf.	+ 2	+ 2	schwache Phagocytose	starke
0,05 " " + 0,35 " " "	+ 2	+ 2	sehr schwache	zieml. starke
0,01 " " + 0,4 " " "	+ 2	+ 2	θ	sehr geringe
0,1 " " + 0,3 Pk. Aggr.	+ 2	+ 2	θ	θ
0,05 " " + 0,35 " " "	+ 2	+ 2	θ	θ
0,01 " " + 0,4 " " "	+ 2	+ 2	θ	θ
0,4 norm. K.S.	+ 2	+ 2	θ	θ
0,4 NaCl	+ 2	+ 2	θ	θ

Tabelle VI.

	Leuk.	Pnk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,2 Aggr. I.S. + 0,3 inakt. K.S.	+ 2 Trpf.	+ 2 Trpf.	zieml. starke Phagocytose	starke
0,1 " " + 0,4 " " "	+ 2	+ 2	schwache	zieml. starke
0,05 " " + 0,45 " " "	+ 2	+ 2	vereinzelte	schwache
0,2 " " + 0,3 Pk. Aggr.	+ 2	+ 2	θ	sehr geringe
0,1 " " + 0,3 " " + 0,1 inakt. K.S.	+ 2	+ 2	θ	θ
0,05 " " + 0,3 " " + 0,15 " " "	+ 2	+ 2	θ	θ
0,5 norm. K.S.	+ 2	+ 2	θ	θ
0,5 NaCl	+ 2	+ 2	θ	θ

Die Versuche (Tabelle III, IV, V und VI) stellen gleichzeitig eine Art Austitrierung der bakteriotropen Wirkung unseres Immunserums dar. Es geht aus ihnen hervor, daß bei der Dosis von 0,01 ccm Immunserum auf 0,4 ccm inaktiviertes Kaninchenserum die bakteriotrope Wirkung fehlte, daß dieselbe bei der Dosis von 0,05 ccm an Intensität zunahm. Die Menge von 0,3 ccm Pneumokokkenaggressin paralyisierte die Wirkung von 0,05 und 0,1 ccm Immunserum vollständig, bei 0,2 und 0,3 ccm Immunserum konnte noch einzelne Phagocytose konstatiert werden. Es war also eine tatsächliche Gegenwirkung von Aggressin und Antiaggressin in vitro festzustellen.

Weniger günstig verliefen Versuche, die Phagocytosewirkung durch Aggressin zu hemmen, wenn die Mischung von Aggressinimmunserum und Leukocyten nicht unmittelbar im Reagenzglas vorgenommen wurde, sondern wenn Pneumokokken vorher mit dem Immunserum sensibilisiert wurden. Es gelang zwar bei dieser Versuchsanordnung, die Phagocytose im Vergleich zu den Kontrollen abzuschwächen, doch war eine so vollständige oder nahezu vollständige Beseitigung derselben nicht zu erreichen. Es sei dazu bemerkt, daß sich die mit Immunserum sensibilisierten Pneumokokken überhaupt eigentümlich verhielten, indem sie von den Leukocyten zwar in Kaninchenserum, nicht aber in Kochsalzlösung aufgenommen wurden. Offenbar hängt das mit der großen Widerstandsfähigkeit unseres Pneumokokkenstammes gegen die Phagocytose zusammen.

Die Versuchsanordnung war so, daß Pneumokokken von Serumkultur mit reichlichen Mengen von Immunserum 1 Stunde bei 37° C gehalten wurden. Dabei trat regelmäßig eine Zusammenballung der Pneumokokken ein. Hierauf wurde zentrifugiert, der Bodensatz gewaschen und in Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Diese Aufschwemmung wurde tropfenweise den Kaninchenleukocyten, welche teilweise in normalem Kaninchenserum, teilweise in Aggressin, teilweise in Kochsalzlösung suspendiert waren, zugesetzt.

Tabelle VII.

## Versuch 1.

	Leuk.	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,3 norm. K.S. + 0,3 Pk. Agg. + 2 Trpf. + 2 Trpf.			schwache Phagocytose	zieml. starke
0,3 NaCl. + 0,3 „ „ + 2 „ + 2 „			sehr schwache	mäßige
0,6 norm. K.S. + 2 „ + 2 „			starke	sehr starke
0,6 NaCl. + 2 „ + 2 „			ø	ganz vereinz.

## Versuch 2.

	Leuk.	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,3 norm. K.S. + 0,3 Pk. Agg. + 2 Trpf. + 2 Trpf.			schwache Phagocytose	zieml. starke
0,3 NaCl. + 0,3 „ „ + 2 „ + 2 „			schwache	zieml. starke
0,6 norm. K.S. + 2 „ + 2 „			starke	sehr starke
0,6 NaCl. + 2 „ + 2 „			ø	vereinzelt

## Versuch 3.

	Leuk.	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,3 norm. K.S. + 0,3 Pk. Agg. + 2 Trpf. + 2 Trpf.			schwache Phagocytose	zieml. starke
0,3 NaCl. + 0,3 „ „ + 2 „ + 2 „			vereinzelte	schwache
0,6 norm. K.S. + 2 „ + 2 „			starke	sehr starke
0,6 NaCl. + 2 „ + 2 „			ø	ganz vereinz.

Man sieht bei Betrachtung dieser Tabelle zunächst, daß nach 1-stündigem Aufenthalt bei 37° C die Phagocytosehemmung sensibilisierter Kokken durch Aggressin recht deutlich ist, während sie nach 2-stündigem Aufenthalt undeutlich wird. Auffallend war es ferner, daß in Mischungen von Kochsalzlösung und Aggressin eine weit stärkere Phagocytose als in Kochsalzlösung allein zustande kam. Es scheint also, daß der begünstigende Einfluß, den das normale Kaninchenserum auf die zur Phagocytose bereits sensibilisierten Kokken ausübt, im Aggressin noch vorhanden ist.

Es sieht ganz so aus, als ob mindestens für den benutzten Stamm außer der Sensibilisierung durch das bakteriotrope Serum noch eine Komponente für die volle Entfaltung der phagocytären Serumwirkung notwendig wäre. Diese ist im normalen Serum enthalten, fehlt aber in Kochsalzlösung, in welcher Phagocytose nahezu ausbleibt. Im Aggressin ist diese Komponente trotz dessen sonstiger antibakteriotroper Wirkung erhalten. Es sei hinsichtlich dieses paradoxen Verhaltens auf

die Beobachtung von Weil hingewiesen, welcher fand, daß man mit Subtilisaggressin, welches sonst Phagocytose hemmt, gleichwohl Bakterien opsonisch sensibilisieren kann.

Es ist nicht leicht, die einigermaßen abweichenden Ergebnisse der Versuche mit Mischung von Aggressin und Immunserum und derer mit sensibilisierten Kokken zu erklären. Es hatte den Anschein, als ob das Aggressin das Herantreten der bakteriotropen Serumwirkung an die Pneumokokken verhindern würde.

Die diesbezüglichen Versuche wurden in der Weise an- gestellt, daß Pneumokokken eine Stunde lang der Wirkung einer Mischung aus Aggressinimmunserum und Aggressin bei 37° C ausgesetzt wurden. In einer Kontrollprobe wirkte auf die gleiche Menge von Kokken eine Mischung von Immunserum und inaktiviertem normalen Kaninchenserum ein. Nach Abzentrifugieren und Waschen der so sensibilisierten Kokken wurden dieselben in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und den Leukocyten zugesetzt, welche teils in normalem Kaninchenserum, teils in Kochsalzlösung suspendiert waren.

Tabelle VIII.

I. Mit Mischung (0,5 ccm Aggressinimmunserum + 0,5 ccm Pneumokokkenaggressin) wurden Pneumokokken 1 Stunde bei 37° C sensibilisiert, hierauf zentrifugiert. Der Bodensatz wurde gewaschen, in Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

	Leuko- cyten	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,5 ccm normal. Kan.-Ser. + 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	schwache Phagocyt.	ziemlich starke
0,5 „ NaCl	+ 2 „	+ 2 „	θ	θ

II. Mit Mischung (0,25 ccm Aggressinimmunserum + 0,5 ccm Pneumokokkenaggressin) wurden Pneumokokken in gleicher Weise wie I. behandelt.

	Leuko- cyten	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,5 ccm normal. Kan.-Ser. + 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	sehr schwache	schwache
0,5 „ NaCl	+ 2 „	+ 2 „	θ	θ

III. Mit Mischung (0,25 ccm Aggressinimmunserum + 0,5 ccm norm. aktiv. Kaninchenserum) wurden Pneumokokken in gleicher Weise wie I. behandelt.

	Leuko- cyten	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,5 ccm normal. Kan.-Ser. + 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	starke	sehr starke
0,5 „ NaCl	+ 2 „	+ 2 „	θ	ganz vereinz.

Tabelle IX.

Versuchsordnung die gleiche wie in Tabelle VIII. Das Pneumokokkenaggressin war ganz frisch.

I. Mit Mischung (0,5 ccm Aggressinimmunserum + 0,5 ccm Pneumokokkenaggressin) wurden Pneumokokken sensibilisiert.

	Leuko- cyten	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,5 ccm normal. Kan.-Ser. + 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	schwache Phagocyt.	ziemlich starke
0,5 „ NaCl	+ 2 „	+ 2 „	θ	θ

II. Mit Mischung (0,25 ccm Aggressinimmunserum + 0,5 ccm Pneumokokkenaggressin) wurden Pneumokokken sensibilisiert.

	Leuko- cyten	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,5 ccm normal. Kan.-Ser. + 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	sehr schwache	schwache
0,5 „ NaCl	+ 2 „	+ 2 „	θ	θ

III. Mit Mischung (0,25 ccm Aggressinimmunserum + 0,5 ccm norm. aktiv. Kaninchenserum) wurden Pneumokokken sensibilisiert.

	Leuko- cyten	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,5 ccm normal. Kan.-Ser. + 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	+ 2 Tropf.	starke	sehr starke
0,5 „ NaCl	+ 2 „	+ 2 „	θ	ganz vereinz.

Tabelle X.

Versuchsordnung wie in Tabelle VIII. Das Pneumokokkenaggressin war ebenfalls ganz frisch.

I. Mit Mischung (0,25 ccm Aggressinimmunserum + 0,5 ccm Pneumokokkenaggressin) wurden Pneumokokken sensibilisiert.

	Leuko- cyten	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,5 ccm normal. Kan.-Ser. + 2 Tr.	+ 2 Tr.	+ 2 Tr.	sehr schwache Phagocytose	mäßige
0,5 „ NaCl	+ 2 „	+ 2 „	θ	θ

II. Mit Mischung (0,1 ccm Aggressinimmunserum + 0,5 ccm Pneumokokkenaggressin) wurden Pneumokokken sensibilisiert.

	Leuko- cyten	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,5 ccm normal. Kan.-Ser. + 2 Tr.	+ 2 Tr.	+ 2 Tr.	ganz vereinz.	vereinzelte
0,5 „ NaCl	+ 2 „	+ 2 „	θ	θ

III. Mit Mischung (0,1 ccm Aggressinimmunserum + 0,5 ccm normales aktives Kaninchenserum) wurden Pneumokokken sensibilisiert.

	Leuko- cyten	sensib. Pk.	Nach 1 Std.	Nach 2 Std.
0,5 ccm normal. Kan.-Ser. + 2 Tr.	+ 2 Tr.	+ 2 Tr.	ziemlich starke	sehr starke
0,5 „ NaCl	+ 2 „	+ 2 „	θ	θ



Man sieht aus diesen Versuchen, daß bei Mischung von gleichen Teilen von Aggressin und Immunserum die Sensibilisierung der Kokken noch eine relativ gute war. Ueberwiegt aber die Menge des Aggressins die des Immunserums, so wird die Sensibilisierung eine sehr unvollständige und bei Zusatz von Leukocyten tritt nur sehr geringe Phagocytose ein. Daraus mußte der Schluß gezogen werden, daß das Aggressin die Phagocytose durch Behinderung der bakteriotropen Immunserumwirkung unterdrückt. Das steht im Einklang mit den erwähnten Versuchen, bei denen es nicht gelang, die Phagocytose der bereits sensibilisierten Kokken durch Aggressin vollkommen zu unterdrücken.

Es ist bis auf weitere Untersuchungen nicht zu sagen, ob dieser Mechanismus der Aggressinwirkung nur für den benutzten Stamm von Pneumokokken Geltung hat oder für Pneumokokken überhaupt. Denn diese verhalten sich gegenüber der Phagocytose recht verschieden und es bleibt daher noch fraglich, ob nicht für Stämme, welche schon im normalen Tierserum Bakteriotropine vorfinden, jene Wirkungsweise des Aggressins, die Weil und Nakayama für ihre Versuche feststellen konnten, Geltung hat. Für unseren Fall mit spezifischem antiaggressiven Immunserum tritt der Gegensatz zwischen Aggressin und Antiaggressin sehr deutlich hervor.

#### Zusammenfassung.

- 1) Es gelingt leicht, Kaninchen durch Pneumokokkenaggressin zu immunisieren. Das Serum dieser Tiere besitzt bakteriotrope Eigenschaften.
- 2) Die bakteriotrope Serumwirkung wird bei Anwendung einer Mischung von Immunserum und Aggressin unterdrückt.
- 3) Diese Phagocytosehemmung durch Aggressin tritt bei Verwendung bereits sensibilisierter Kokken viel weniger hervor.
- 4) Das Aggressin scheint das Herantreten der Bakteriotropine an die Kokken zu verhindern.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem bakteriologischen Laboratorium des k. und k. Militär-sanitätskomitees in Wien.]

### **Studien über Anaphylaxie.**

#### **III.**

#### **Der anaphylaktische Immunkörper und seine Beziehungen zum Eiweißantigen.**

Von Privatdozent **R. Doerr** und **V. K. Russ**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. Juli 1909.)

In unserer letzten Mitteilung (s. diese Zeitschr., Bd. 2, Heft 1) haben wir zum erstenmal eine Methode angegeben, welche ein quantitatives Arbeiten auf dem Gebiete der Serum-anaphylaxie ermöglicht, wenn man sich eines bestimmten Versuchstieres, des Meerschweinchens, bedient. Auf dieser Basis fußend, gelang es uns, nachzuweisen, daß die sensibilisierende Substanz im artfremden Serum zweifellos identisch ist mit der bei der Reinjektion toxisch wirkenden Komponente und daß die bisherigen Versuche, zwei verschiedene Körper für die beiden Wirkungen verantwortlich zu machen, nicht als stichhaltig angesehen werden können. Weder durch fraktionierte Fällung der Sera mit Ammonsulfat (Gay und Adler), noch durch Erhitzen auf höhere Temperaturen (Besredka, Kraus und Volk, Arthus) ist man imstande, das Sensibilisinogen bei Zerstörung oder Ausschaltung der toxischen Fähigkeit intakt zu erhalten und umgekehrt. Um nicht mißverstanden zu werden, betonen wir nochmals ausdrücklich, daß wir nirgends behauptet haben, man könne mit stark (90° C und darüber) erhitztem Eiweiß überhaupt nicht sensibilisieren. Mit großen Dosen wird man vielleicht etwas ausrichten (Besredka, Uhlenhuth), wir selbst haben es gar nicht versucht. Von der Tatsache ausgehend, daß natives Serum schon in tausendfach kleineren Mengen sensibilisiert, als man zur Auslösung des anaphylaktischen Shocks beim hypersensiblen Tier benötigt, haben wir folgerichtig auch bei den erhitzten Seris.

diese Differenz berücksichtigt und davon Abstand genommen, allzuhohe Dosen derselben auf ihren Gehalt an Sensibilisogen zu prüfen, da wir keine Möglichkeit sahen, tausendfach größere Volumina den Tieren einzuverleiben, um Aufschlüsse über die Toxizität zu erhalten. In den untersuchten Breiten, wie sie durch die Technik des Tierexperimentes begrenzt waren, zeigte sich ein völliger Parallelismus; bei 90—100° C hatte nicht nur die Toxizität injizierbarer Mengen aufgehört, sondern auch das Sensibilisierungsvermögen hatte derart gelitten, daß nicht einmal 0,01 (das Tausendfache der Dos. sensibilis. min. vom Normalserum) Ueberempfindlichkeit hervorrief. Darauf kam es uns eben an; damit war gezeigt, daß durch Erhitzen Sensibilisierungsvermögen und Toxizität gleichmäßig alteriert werden, indem die nach den beiden Richtungen wirksamen Dosen unter Wahrung des schon beim Nativserum existierenden Abstandes einfach gleichmäßig nach oben rücken. Die Frage, ob stark erhitzte Sera Tiere überhaupt zu sensibilisieren vermögen oder nicht, ist für die Theorie belanglos; sie hat dagegen für die praktische Verwertung der Anaphylaxie zur Differenzierung gekochten Eiweißes Bedeutung (Uhlenhuth).

**Was bei der Reinjektion hypersensibler Tiere giftig wirkt, ist also das Eiweißantigen selbst.**

Ferner konnteargetan werden, daß dieses anaphylaktische Antigen in den Globulinfraktionen des Serums enthalten ist und daß die Albumine, wenn überhaupt, nur äußerst wenig wirksam sind. Wir wiesen schon damals darauf hin, daß auch das präzipitinogene Vermögen bei den verschiedenen Fraktionen des Serumeiweißes ganz analoge Unterschiede aufweist, eine Analogie, die, wie noch erörtert werden soll, keineswegs rein äußerlich ist, sondern ihre Begründung im Wesen der anaphylaktischen Reaktion findet.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem

anaphylaktischen Immunkörper.

Es war von vornherein klar, auf welchem Wege genauere Aufschlüsse über denselben und seine Beziehungen zum Eiweißantigen zu erhalten sein dürften. Man brauchte sich nur an das Paradigma der Entwicklung der Antitoxinlehre zu halten;

wie bekannt, hat hier nicht so sehr das Studium der aktiven antitoxischen Immunität fördernd gewirkt, als vielmehr die Analyse der Relationen, welche sich zwischen dem vom antikörperproduzierenden Organismus losgelösten Antitoxin und dem zugehörigen Gifte ergaben. Die heterologe passive Uebertragung antitoxischer Sera auf andere Versuchstiere war das experimentelle Prinzip, welches sich in der Hand Ehrlichs so außerordentlich fruchtbar erwies. Da wir nun seit Otto wissen, daß eine derartige **heterologe passive Uebertragung** auch beim anaphylaktischen Immunkörper möglich ist, da ferner Doerr und Raubitschek in ihren Versuchen mit Aalserum weitere Belege für die Brauchbarkeit dieser Methode gegeben, so lag kein Hindernis vor, dieselbe für die Erforschung der Eiweißimmunsustanzen in größerem Maßstabe zu verwenden.

Die Versuchsanordnung gestaltete sich also im allgemeinen derart, daß 2—3 kg schwere Kaninchen systematisch mit artfremdem Serum vorbehandelt und zu verschiedenen Zeiten zur Ader gelassen wurden. Die gewonnenen Immunsera wurden Meerschweinchen von 200—250 g intraperitoneal injiziert und die erzeugte Anaphylaxie nach genau 24 Stunden durch intravenöse Zufuhr des zur Immunisierung verwendeten Serums geprüft. Die Einhaltung des bezeichneten Intervalles ist, wie wir noch später sehen werden, für die Erzielung gleichmäßiger Resultate erforderlich.

### I.

In engstem Anschlusse an die von uns schon früher bei der aktiven Meerschweinchenanaphylaxie festgestellten Tatsachen ergab sich auch hier, daß nur Vollsera oder die aus denselben ausgesalzene Globuline, nicht aber die Albumine, die Bildung von freiem Antikörper im Kaninchenorganismus anregen, d. h. antigen wirken. Das erhellt aus folgenden

### Versuchen.

Kaninchen 500 erhielt am 10. und 12. I. je 0,2, am 14., 16., 20., 22., 24. und 26. I. je 0,1 ccm Rinderserum subkutan, am 20. II. 3,0, am 26. II. 5,0, am 4. III. 5,0 ccm intraperitoneal. Aderlaß am 15. III. Von diesem Serum erhielten 4 Meerschweinchen je 1,0 ccm intraperitoneal und

24 Stunden später fallende Dosen Rinderserum intravenös. — Sie reagierten, wie folgt:

M. 1	0,2	Rinders. iv.	+ 5'
" 2	0,02	" "	+ 3'
" 3	0,01	" "	+ 5'
" 4	0,002	" "	deutl. Symptome, erholt sich rasch.

Kaninchen 455 erhielt die durch Dialyse und Umfällen (die Technik s. unsere frühere Arbeit) gereinigten Eiweißkörper, welche bei  $\frac{1}{3}$  Sättigung von Rinderserum mit Ammonsulfat ausfallen, und zwar am 21., 26. II. und 4. III. je 5 ccm ip. (berechnet auf Vollserum). Aderlaß am 14. III.

M. 5 am 18. III. 1,0 Ser. 454, am 19. III. 0,1 Rinders. iv.; schwerste S., † in 1<sup>h</sup>  
 „ 6 „ 18. III. 0,5 „ 454, „ 19. III. 0,01 „ deutl. Sympt.

Kaninchen 472, mit denselben Globulinen nach dem gleichen Schema immunisiert. Aderlaß am 14. III.

M. 7 am 18. III. 1,0 Serum 472, am 19. III. 0,1 Rinders. iv.; schwerste S., agonal.  
 „ 8 „ 18. III. 0,5 „ 472, „ 19. III. 0,2 „ „ „ „ „

Kaninchen 419, nach demselben Schema immunisiert wie 454 und 472, jedoch mit Albumin aus Rinderserum (Ausfällen mit sukzessiver  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{3}{4}$  Sättigung, jeweiliges Abfiltrieren der Niederschläge und Sättigung des Restes mit Ammonsulfat in Kristallen, Dialyse).

M. 9 am 18. III. 1,0 S. 419 ip., am 19. 0,1 Rinders. iv., zeigt nichts  
 „ 10 „ 18. III. 0,5 „ 419 „ „ 19. 0,2 „ „ ohne Reaktion

Das Kaninchen 419 bekam am 15. III, noch volle 20,0 ccm Albuminlösung ip., der nächste Aderlaß lieferte aber wieder ein unwirksames Serum:

M. 11 am 25. III. 3,0 Serum 419, am 26. 0,2 Rinders. iv., keine Reaktion.

Ebenso negativ verlief die Immunisierung mit Rinderalbumin bei einem zweiten Kaninchen 412.

## II. Wertbestimmung des Immunkörpers.

Schon bei diesen ersten Versuchen drängte sich uns die Ueberzeugung auf, daß man die Menge des anaphylaktischen Immunkörpers in einem gegebenen Serum quantitativ bestimmen kann. Im weiteren Ausbau der Versuchsreihen fanden wir schließlich drei Methoden, welche ein direktes Messen unter Zuhilfenahme des Meerschweinchens als Reagens gestatten.

1) Man injiziert eine Reihe von Meerschweinchen mit einer bestimmten Menge des zu untersuchenden Serums, z. B. 1,0 intraperitoneal, und prüft in 24 Stunden mit fallenden Dosen des korrespondierenden Eiweißantigens intravenös.

Als Beispiel mag das schon erwähnte Serum des Kaninchens 500 dienen, das einen selten hohen Titer besaß. Ferner seien noch zwei Reihen aus der großen Zahl unserer Versuche zitiert:

Serum 475 stammte von einem lange und energisch vorbehandelten Kaninchen (am 10. und 12. I. je 0,2, am 14., 16., 20., 22., 24. und 26. I. je 0,1 ccm subkutan, am 20. II. 3,0, am 26. II. 5,0, am 4. III. 5,0, am 15. III. 5,0, am 2. IV. 3,0, am 20. IV. 3,0 und am 26. IV. 6,0 Rinder-serum intraperitoneal). Am 3. V. wurde das Tier entblutet. Die Serumprüfung ergab:

M. 20	am 4. V. je 1,0 Se- rum 475 ip.	am 5. V. 0,5	Rinders. iv.	† 5'
" 21		" 5. V. 0,4	" "	† 5'
" 22		" 5. V. 0,25	" "	† 12'
" 23		" 5. V. 0,2	" "	† 5'
" 24		" 5. V. 0,1	" "	† 5'
" 25		" 5. V. 0,05	" "	† 5'
" 26		" 5. V. 0,01	" "	deutl. Sympt., legt sich aber nicht um
" 27		" 5. V. 0,005	" "	leichteste Sympt.

Serum 454 stammte von dem bereits erwähnten mit Globulinen bis zum 30. V. weiter immunisierten Kaninchen. Am 7. VI. entblutet. Serumprüfung:

M. 120	am 8. VI. 1,0 Serum 454 ip.	am 9. VI. 1,0	Rinders. iv.	schwerste S., erholt sich
" 121		" 9. VI. 0,4	" "	keine Reaktion
" 122		" 9. VI. 0,2	" "	

Wir haben also drei Rinderantisera vor uns, von welchen das erste (500) in 1,0 ccm so viel Immunkörper enthält, daß schon 0,01 Rinder Serum akut tötet; beim zweiten, nicht viel schwächeren, sind 0,05 erforderlich, beim dritten, sehr schwachen, reicht nicht einmal 1,0 aus.

2) Kann man auch umgekehrt mit fallenden Dosen Immunserum vorbehandeln und mit einer konstanten Menge Antigen (0,01—0,1 ccm) den Shock auslösen.

Serum 475 (siehe oben) liefert folgende Reihe:

M. 30	am 4. V. 1,0 Ser. 475 ip.,	am 5. V. 0,1	Rinders. iv.	† 5'
" 31	" 4. V. 0,8 " 475 "	" 5. V. 0,1	" "	† 5'
" 32	" 4. V. 0,6 " 475 "	" 5. V. 0,1	" "	† 5'
" 33	" 4. V. 0,4 " 475 "	" 5. V. 0,1	" "	† 5'
" 34	" 4. V. 0,2 " 475 "	" 5. V. 0,1	" "	schwerste Sympt., † in 5 Stunden
" 35	" 4. V. 0,1 " 475 "	" 5. V. 0,1	" "	leichte, sehr ver- zögerte S.

Serum 500 (siehe oben).

M. 40	am	17. III.	1,0	Ser. 500	ip.,	am	18. III.	0,01	Rinders.	iv.	† 5'
„ 41	„	17. III.	0,5	„ 500	„ „	„	18. III.	0,01	„ „	„	schwerste S.,
„ 42	„	17. III.	0,3	„ 500	„ „	„	18. III.	0,01	„ „	„	erholt sich
„ 43	„	17. III.	0,1	„ 500	„ „	„	18. III.	0,01	„ „	„	deutl. Sympt.,
											ø

3) Man versetzt das Serum, und zwar jedesmal eine bestimmte Quantität, z. B. 1,0 ccm, mit steigenden Mengen Antigen in vitro, injiziert die Gemische intraperitoneal und prüft am nächsten Tag mit massiven Antigendosen intravenös.

Auf diese Art der Messung des anaphylaktischen Immunkörpers verfielen wir durch folgende Wahrnehmung: Wenn man Meerschweinchen mit hochwertigen Eiweißantiseris intraperitoneal vorbehandelt und am nächsten Tage mit sehr kleinen Antigenmengen reinjiziert, so zeigen die Tiere Symptome, überleben aber und bleiben gegen eine abermalige Antigenezufuhr empfindlich, und zwar um so empfindlicher, je kleiner die erste Prüfungsdosis war. Behandelt man mit niederwertigen Antiseris, so reagieren die Tiere nur auf die erste Antigenapplikation, gegen die zweite sind sie unempfindlich, wenn man will, antianaphylaktisch. Es findet also eine Absättigung des Antikörpers im Organismus des Meerschweinchens durch die erste Antigeninjektion statt, die um so vollständiger ist, je mehr Antigen verwendet wurde und je kleiner die Menge der Immuns substanz im passiv anaphylaktisierenden Serum war.

Das zeigt schlagend folgender Versuch: Die Kaninchen 401 und 449 waren ganz gleichartig mit Menschenserum immunisiert worden. Sie hatten am 26. und 28. Mai sowie am 2. Juni je 1,0 ccm subkutan, am 3. und 7. Juni je 2,0 ccm intravenös erhalten. Beide wurden am 14. Juni entblutet. Die Bestimmung des anaphylaktischen Immunkörpers erfolgte bei beiden nach Methode 1; die Prüfung der Ueberempfindlichkeitsreste = Antianaphylaxie ergibt sich aus den Tabellen.

.

## Serum 401.

M. 100	am 18. VI. 1,0 Serum 401 ip.	am 19. VI. 0,5	Menschens. : verspätete S., † in 1 Stunde		
.. 101		„ 19. VI. 0,2	„ : dgl.		
„ 102		„ 19. VI. 0,1	„ : verspätete S., erholt sich		θ
„ 103		„ 19. VI. 0,08	„ : dgl.	am 20. VI.	θ
„ 104		„ 19. VI. 0,05	„ : dgl.	0,2 Men-	θ
„ 105		„ 19. VI. 0,04	„ : dgl.	schens Serum	θ
„ 106		„ 19. VI. 0,02	„ : leichteste S.		θ
„ 107		„ 19. VI. 0,005	„ : θ		θ

## Serum 449.

M. 110	am 18. VI. 1,0 Serum 449 ip.	am 19. VI. 0,1	Menschens. : † 5'		
„ 111		„ 19. VI. 0,08	„ : † 5'		
„ 112		„ 19. VI. 0,05	„ : † 5'		
„ 113		„ 19. VI. 0,04	„ : † 10'		
„ 114		„ 19. VI. 0,035	„ : s. S., erholt sich	am 20. VI.	{ schwerste Symptome
„ 115		„ 19. VI. 0,02	„ : s. S., erholt sich	0,2 Men-	
„ 116		„ 19. VI. 0,01	„ : leichte S.	schens Serum	
„ 117		„ 19. VI. 0,005	„ : Spur	iv.	

Serum 449 hatte nach der ersten Methode bestimmt mehr Immunkörper als 401 (Dos. letalis acuta 0,04 gegen mehr als 0,5). Dementsprechend wurde die Hypersensibilität (bedingt durch 1,0 ccm) bei Serum 449 auch durch 0,035 nicht abgesättigt, bei Serum 401 schon durch 0,005 ccm Menschenserum. Friedberger hat kürzlich angegeben, daß die Antianaphylaxie beim aktiven sensibilisierten Tiere nur eine „Anaphylaxie refracta dosi“ sei; es scheint überflüssig, hervorzuheben, wie glänzend sich diese Anschauung bei der passiven Uebertragung bestätigt hat.

Daraus erflöß aber mit zwingender Notwendigkeit die Annahme, daß auch bei Injektionen der **Gemenge** von Antigen + Immunkörper eine Absättigung des letzteren stattfinden müsse, die je nach der zugesetzten Antigenmenge total oder partiell sein kann. Das Experiment ergab die Richtigkeit dieser (im Gegensatz zu Ottos ursprünglichen Angaben stehenden) Voraussetzung und damit die Möglichkeit der oben geschilderten Wertbemessung der Eiweißantikörper durch stufenweise Neutralisation mit Antigen.

Wir haben sie bei drei Seris durchgeführt, und stimmen die Ergebnisse mit den nach Methode 1 gewonnenen Resultaten.



Serum von Kaninchen 455 (am 30. V. und 2. VI. 1,0 Hühnerserum subkutan, am 3., 7. und 15. VI. 2,0 intravenös). Probeaderlaß am 26. VI.

M. 200	erhält am 27. VI. 1,0 S. 455 + 0,005 Hühners. ip.				
" 201	" " 27. VI. 1,0 " 455 + 0,008 " "				
" 202	" " 27. VI. 1,0 " 455 + 0,01 " "				
" 203	" " 27. VI. 1,0 " 455 + 0,015 " "				
" 204	" " 27. VI. 1,0 " 455 + 0,02 " "				
" 205	" " 27. VI. 1,0 " 455 + 0,04 " "				
" 206	" " 27. VI. 1,0 " 455 + 0,08 " "				
" 207	" " 27. VI. 1,0 " 455 + 0,1 " "				
			am 28. VI. 0,25 Hüh- ners. iv.	$\left\{ \begin{array}{l} + 30' \\ + 5' \\ \text{schwerste S., agonal} \\ + 5' \\ + 5' \\ \text{deutl. S., fällt nicht um} \\ \text{dgl.} \\ \text{dgl.} \end{array} \right.$	

Serum von Kaninchen 477 (am 30. V. und 2. VI. je 1,0 Ziegenserum subkutan, am 3., 7. und 15. VI. 2,0 intravenös). 26. VI. Probeaderlaß.

M. 208	erhält am 27. VI. 1,0 S. 477 + 0,005 Ziegens. ip.				
" 209	" " 27. VI. 1,0 " 477 + 0,008 " "				
" 210	" " 27. VI. 1,0 " 477 + 0,01 " "				
" 211	" " 27. VI. 1,0 " 477 + 0,015 " "				
" 212	" " 27. VI. 1,0 " 477 + 0,02 " "				
" 213	" " 27. VI. 1,0 " 477 + 0,04 " "				
" 214	" " 27. VI. 1,0 " 477 + 0,08 " "				
" 215	" " 27. VI. 1,0 " 477 + 0,1 " "				
			am 28. VI. 0,25 Ziegens.	$\left\{ \begin{array}{l} \text{schwerste S.} \\ + 5' \\ + 30' \\ \text{schwerste S.} \\ + 30' \\ \emptyset \\ \emptyset \\ \emptyset \end{array} \right.$	

Serum von Kaninchen 423 (am 26., 28. V., 2. VI. je 1,0 Menschenserum subkutan, am 3., 7. und 15. VI. 2,0 intravenös). 26. VI. entblutet.

M. 216	erhält am 27. VI. 1,0 S. 423 + 0,005 Menschens. ip.				
" 217	" " 27. VI. 1,0 " 423 + 0,008 " "				
" 218	" " 27. VI. 1,0 " 423 + 0,01 " "				
" 219	" " 27. VI. 1,0 " 423 + 0,015 " "				
" 220	" " 27. VI. 1,0 " 423 + 0,02 " "				
" 221	" " 27. VI. 1,0 " 423 + 0,04 " "				
" 222	" " 27. VI. 1,0 " 423 + 0,08 " "				
" 233	" " 27. VI. 1,0 " 423 + 0,1 " "				
			am 28. VI. 0,25 Men- schens.	$\left\{ \begin{array}{l} \text{deutl. Symptome} \\ \emptyset \\ \emptyset \\ \emptyset \\ \emptyset \\ \emptyset \\ \emptyset \\ \emptyset \end{array} \right.$	

Beim stärksten Serum war also der Immunkörper selbst durch 0,1 ccm Antigen noch nicht völlig neutralisiert, beim mittleren schon durch 0,04, beim schwächsten durch 0,008.

Welche von den angeführten drei Methoden der Wertbestimmung man in Anwendung bringt, ist natürlich gleichgültig, da die ganze Messung doch nur theoretischen Wert hat; wir haben die glattesten Reihen mit den sub 1) und 2) zitierten Anordnungen erzielt, vielleicht weil uns gegen Abschluß unserer Arbeit kein gleichmäßiges Meerschweinchenmaterial mehr zur Durchführung des dritten Prüfungsmodus zur Verfügung stand. Nur zum Zwecke einer leichten Verständigung über die Wertigkeit der Eiweißantisera möchten

wir als anaphylaktische Immuneinheit ein Serum vorschlagen, von dem 1,0 intraperitoneal injiziert, ein Meerschweinchen von 250 g so empfindlich macht, daß 0,2 ccm Serumantigen, nach 24 Stunden intravenös nachinjiziert, gerade noch akuten Tod auslöst. Im Verhältnis zu diesem einfachen Serum wäre ein zweifaches so beschaffen, daß mit 1,0 vorbehandelte Meerschweinchen schon auf 0,1 Serum akut verenden, ein hundertfaches ein solches, welches derart passiv sensibilisiert, daß 0,002 Antigen akuten Tod bedingen usf.

Es kommt ab und zu vor, daß Meerschweinchen, auch mit den stärksten Seris vorbehandelt und mit hohen Dosen Antigen nachinjiziert, nicht reagieren. Die Zahl solcher refraktärer Tiere betrug bei unserem Material (über 600 Tiere) etwa 7 Proz. Die Ursache vermögen wir zurzeit nur vermutungsweise anzugeben (s. weiter unten). Die Erscheinung an sich ist so selten, daß sie bei Versuchsreihen von 4—8 Tieren nicht weiter stört. Nur bei Experimenten mit 1 oder 2 Meerschweinchen können durch solche individuell resistente Tiere Fehlerquellen bedingt werden; auf die Art läßt sich ja aber auch eine Messung anderer Immunsubstanzen ebensowenig ausführen.

### **III. Das Intervall zwischen passiv anaphylaktisierender Injektion und dem Manifestwerden des anaphylaktischen Zustandes; Verankerung passiv einverleibter Eiweißantikörper.**

Seit Nicolle und Otto wissen wir, daß Tiere nicht sofort überempfindlich werden, wenn man ihnen Eiweißantiserum einverleibt, sondern daß eine gewisse Zeit verstreichen muß, bevor sich der passiv anaphylaktische Zustand voll entwickelt hat. Dementsprechend löst auch die Injektion der Gemische von Antigen und Immunkörper meist keine Symptome bei normalen Tieren aus. Zur Bestätigung dieser bereits bekannten Tatsachen mögen folgende Versuche dienen:

Das Kaninchenserum 500 rief, wie aus den obigen Protokollen hervorgeht, in Mengen von 1,0 ccm so hochgradige passive Anaphylaxie gegen Rinderserum hervor, daß noch 0,01 des letzteren, nach 24 Stunden eingespritzt, akuten Tod erzeugte. Es war also mindestens 20-fach

Wurde aber 1,0 ccm Serum 500 in vitro mit 0,5 Rinderserum gemischt und sofort intravenös injiziert (Meerschweinchen 500 und 501), so trat keine Reaktion ein; ebensowenig wenn die Dosen auf 2,5 Serum 500 + 1,0 Rinderserum erhöht wurden (Meerschweinchen 503).

Meerschweinchen 504 bekam in die linke Jugularis 1,0 ccm Serum 500, 5 Minuten später in die rechte 0,5 ccm Rinderserum, und zeigte gleichfalls keine auffälligen Erscheinungen.

Man muß daher annehmen, daß zunächst eine Verankerung des anaphylaktischen Immunkörpers an Organzellen stattfindet, die eine gewisse Zeit benötigt; erst dann wirkt die Antigenzufuhr deletär.

Wir haben nun versucht, das Minimum dieser Verankerungsperiode festzustellen, indem wir ausreichenden Immunkörper **direkt in die Blutbahn** brachten (linke Jugularis) und nach abgestuften Zeiten zugehöriges Eiweißantigen in die rechte Jugularvene injizierten. Dabei stellte sich heraus, daß 4 Stunden verrinnen müssen, bevor ausreichend viel Immunkörper an der richtigen Stelle fixiert ist, wenn auch Spuren stattgefundener Verankerung schon vor Ablauf dieser Frist unverkennbar sind.

#### Versuch.

Meerschw. 500 erhält 1,0 Serum 475 (s. oben) in die linke Jugularis; nach 50' 0,25 Rinderserum in die rechte; verzögerte, leichteste Symptome.

Meerschw. 501 erhält 2,0 Serum 475 iv., nach 60' 0,25 Rinderserum; verzögerte Reaktion, leichte, aber deutliche Symptome.

Meerschw. 502 erhält 1,0 Serum 475 iv., nach 1<sup>h</sup> 30' 0,25 Rinderserum; verzögerte Symptome, fällt um, richtet sich aber sofort wieder auf und erholt sich langsam.

Meerschw. 503 erhält 1,0 Serum 475 iv., nach 2<sup>h</sup> 0,25 Rinderserum nach 4' schwere Symptome, Krämpfe, legt sich auf die Seite, nach weiteren 6' erholt, setzt sich wieder auf.

Meerschw. 504 erhält 1,0 Serum 475 iv., nach 2<sup>h</sup> 30' 0,25 Rinderserum; fällt nach 2 $\frac{1}{2}$ ' um, Krämpfe, bleibt stundenlang agonal und verendet schließlich.

Meerschw. 505 erhält 1,0 Serum 475 iv., nach 3<sup>h</sup> 0,25 Rinderserum; fällt nach 3' um, Krämpfe, agonal, erholt sich aber wieder.

Meerschw. 506 erhält 1,0 Serum 475 iv., nach 4<sup>h</sup> 0,25 Rinderserum; fällt nach  $\frac{1}{2}$ ' um, Krämpfe, Exitus in 5'.

**Bei intraperitonealer Einverleibung passiv anaphylaktisierender Sera und den hierbei obwaltenden ungünstigeren**

Verteilungs- und Resorptionsverhältnissen ist die Inkubation der passiven Anaphylaxie natürlich wesentlich verlängert. Auch nach 12 Stunden ist das Maximum noch nicht erreicht:

Meerschw. 600 erhält am 25. VI. abends 1,0 Serum 449 (s. oben) ip.; am 26. VI. früh nach 12<sup>h</sup> 0,1 Menschenserum und zeigt bloß leichte, wenn auch deutliche Symptome.

Meerschw. 601 erhält am 26. VI. früh 1,0 Serum 449 ip., nach 24<sup>h</sup> 0,1 Rinderserum iv. und verendet binnen 2'.

Daraus erhellt eben die schon früher hervorgehobene Notwendigkeit, stets gleiche Intervalle zwischen passiver Sensibilisierung und Prüfung einzuhalten, am besten 24 Stunden.

Es lag natürlich sehr nahe, zu versuchen, ob man nicht einem immunkörperhaltigen Serum den Eiweißantikörper durch irgendwelche Organzellen eines empfindlichen Tieres, etwa des Meerschweinchens, entziehen kann, also einen Bindungsversuch nach bewährtem Muster anzustellen, mit Berücksichtigung der im lebenden Meerschweinchen notwendigen Bindungszeit von wenigstens 4 Stunden. Leider waren wir nur in der Lage, ein einziges derartiges Experiment auszuführen, und müssen aus äußeren Gründen alles Arbeiten in der eingeschlagenen Richtung für geraume Zeit unterbrechen. Mit aller Reserve führen wir das Resultat an:

Kaninchen 492 hatte am 26. und 28. V., ferner am 2. VI. je 1,0 ccm Rinderserum subkutan, am 3. und 7. VI. je 2,0 ccm iv. erhalten. Am 15. VI. wurde es entblutet. Sein Serum war stark immunkörperhaltig.

M. 300 erh. am 17. VI. 1,0 Ser. 492 ip., am 18. VI. 0,2 Rinderser. ip., † 3'  
 „ 301 „ „ 17. VI. 1,0 „ 492 „ „ 18. VI. 0,04 „ „ † 5'

Je 3,5 ccm dieses Serums wurden gemischt mit 1 g Gehirn, 1 g Niere, 1 g Dünndarm, 1 g Herz und 1 g Leber. Die Organe stammten von einem eben getöteten Meerschweinchen und wurden in sterilen Reibschalen fein zerrieben. Nach 5-stündigem Aufenthalt im Thermostaten wurden die Serumorgangemische zentrifugiert, die überstehenden Flüssigkeiten abpipettiert und je 1,5 ccm normalen Meerschweinchen intraperitoneal injiziert; nach 24<sup>h</sup> erhielten diese Tiere 0,2 Rinderserum intravenös.

M. 302	am 19. VI. 1,5 Ser. 492 (mit Gehirn beh.) ip., am 20. VI. 0,2 R.S. iv.;	θ
„ 303	„ 19. VI. 1,5 „ 492 ( „ Niere „ ) „ „ 20. VI. 0,2 „ „	θ
„ 304	„ 19. VI. 1,5 „ 492 ( „ Darm „ ) „ „ 20. VI. 0,2 „ „	θ
„ 305	„ 19. VI. 1,5 „ 492 ( „ Herz „ ) „ „ 20. VI. 0,2 „ „	† 3'
„ 306	„ 19. VI. 1,5 „ 492 ( „ Leber „ ) „ „ 20. VI. 0,2 „ „	schwere Spt., erholt sich.

Es hat also den Anschein, als ob Gehirn, Niere und Darm den Immunkörper adsorbiert hätten, die Leber unvollkommen, der Herzmuskel gar nicht. Doch sind wir weit entfernt, auf diese vereinzelte Beobachtung bindende Schlüsse zu fundieren.

Hingegen gehört in dieses Kapitel der Immunkörperbindung im Tiere bei passiver Anaphylaxie eine andere, sehr interessante Tatsache.

Der eine von uns hat schon vor längerer Zeit festgestellt, daß **weiße Mäuse** nicht aktiv gegen artfremdes Serum sensibilisiert werden können. Trommsdorf hat dies auf der letzten Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie bestätigt, und wir selbst haben zahllose Versuche mit allen möglichen Variationen der sensibilisierenden, der Prüfungsdosis, des Intervalles usw. angestellt, ohne ein positives Resultat zu erzielen. Das heißt nun offenbar so viel, daß der weißen Maus die immunkörperproduzierenden Zellgruppen fehlen; dann können aber auch die Bedingungen für die Verankerung fertiger zugeführter Eiweißantikörper nicht gegeben sein, d. h. die weiße Maus kann auch nicht passiv anaphylaktisiert werden. Das verhält sich nun in der Tat so:

6 weiße Mäuse erhalten am 20. VI. je 0,5 ccm Menschenantiserum (Kan. 449 s. oben) ip., nach 24<sup>h</sup> 0,2 Menschenserum gleichfalls ip. Keine reagiert, alle überleben.

6 weiße Mäuse bekommen am 20. VI. je 0,5 ccm Rinderantiserum (Kan. 492 s. oben) ip., nach 24<sup>h</sup> je 0,2 Rinderserum ip. Bleiben sämtlich glatt.

#### IV. Die Beziehungen zwischen Präzipitation und anaphylaktischer Reaktion.

Schon bei dem Studium der aktiven Anaphylaxie war uns aufgefallen, daß solche Eiweißkörper, welche nicht oder nur wenig präzipitable Substanz enthalten, z. B. Rinderalbuminlösungen, weder imstande sind, zu sensibilisieren, noch auch giftig auf aktiv sensibilisierte Meerschweinchen wirken.

Wir sind nun diesen Verhältnissen bei passiver Uebertragung genauer nachgegangen.

α) Das Serum des Kaninchens 500, dessen Gehalt an Rindereiweißantikörper bereits besprochen wurde, reagierte in

vitro mit Rindereiweiß, Rinderserumglobulin und Rinderserumalbumin in folgender Art:

**Präzipitationsversuch.**

Zu 1 ccm steigender Verdünnungen von Rinderserum, daraus hergestellten und auf das Volumen des Vollserums aufgefüllten Globulin- und Albuminlösungen wurde je 0,1 ccm Serum 500 zugesetzt. Die Röhrchen kamen für 2 Stunden in den Thermostaten, dann wurde abgelesen. +++ bedeutet starke Niederschläge, ++ deutliche Flocken, + Trübung, 0 Klarheit der Flüssigkeit. (Die anderen Präzipitationsversuche wurden nach demselben Schema angestellt.)

Verdünnung	von Rinderserum	Globulin	Albumin
50	+++	+++	Spur
100	+++	+++	"
200	+++	+++	"
400	+++	+++	"
600	+++	+++	0
800	+++	+++	0
1000	+++	+++	0
1200	+++	++	0
1400	++	++	0
1600	++	++	0
1800	++	+	0
2000	+	+	0
2500	+	+	0
3000	Spur	0	0

Nun wurden Meerschweinchen mit Serum 500 intraperitoneal vorbehandelt und nach 24 Stunden Rinderserum, Albumin- und Globulinlösung intravenös nachinjiziert.

**Prüfung mit Rinderserum.**

M. 200	0,3 S.	500 ip., nach 24 <sup>h</sup>	0,2 Rinders. iv.	schwerste Symptome
" 201	0,3 "	500 " " 24 <sup>h</sup>	0,1 " "	dgl.

**Prüfung mit Rinderglobulin.**

M. 202	0,3 S.	500 ip., nach 24 <sup>h</sup>	4,0 Globulin iv.	+ 5'
" 203	0,3 "	500 " " 24 <sup>h</sup>	2,0 " "	+ 5'
" 204	0,3 "	500 " " 24 <sup>h</sup>	0,5 " "	schwerste Symptome
" 205	0,3 "	500 " " 24 <sup>h</sup>	0,2 " "	0

**Prüfung mit Albumin.**

M. 206	0,3 S.	500 ip., nach 24 <sup>h</sup>	4,0 Albumin iv.	0
" 207	0,3 "	500 " " 24 <sup>h</sup>	2,5 " "	0

Am stärksten toxisch wirkte also Vollserum, etwas weniger die verwendete Globulinlösung, fast gar nicht das Albumin, so daß eine vollständige Parallele bestand mit dem Gehalt der Flüssigkeiten an präzipitierbarer Substanz.

β) Dieselben Verhältnisse ergaben sich bei dem Serum von Kaninchen 454 (immunisiert mit Rinderglobulin). Dieses Serum präzipitierte Rindervollserum, Globulin und Albumin, wie folgt:

Verdünnung	von Rinderserum	Globulin	Albumin
50	++	++	θ
100	+	+	θ
250	+	+	θ
500	Spur	Spur	θ
750	θ	θ	θ
1000	θ	θ	θ

Mit 1,0 ccm dieses Serums vorbehandelte Meerschweinchen verhielten sich nun gegen die 24 Stunden später erfolgende Reinjektion von Rindervollserum, Globulin und Albumin, wie folgt:

Prüfung mit Rinderserum.

M. 209	am 7. VI. 1,0 S. 454 ip.,	am 8. VI. 1,0 Rinders. iv.,	verzög. schwere S.
„ 210	„ 7. VI. 1,0 „ 454 „	„ 8. VI. 0,4 „	θ
„ 211	„ 7. VI. 1,0 „ 454 „	„ 8. VI. 0,2 „	θ

Prüfung mit Rinderglobulin.

M. 212	am 7. VI. 1,0 S. 454 ip.,	am 8. VI. 3,0 Globulin	verzög. schwere S.
„ 213	„ 7. VI. 1,0 „ 454 „	„ 8. VI. 1,0 „	dgl.

Prüfung mit Rinderalbumin.

M. 214	am 7. VI. 1,0 S. 454 ip.,	am 8. VI. 5,0 Albumin	θ
„ 215	„ 7. VI. 1,0 „ 454 „	„ 8. VI. 3,0 „	θ

Auch hier war also der Gehalt an präzipitabler Substanz und anaphylaktischem Antigen übereinstimmend. Ferner lehrt der Vergleich mit Serum 500, welches mehr Präzipitin enthielt, daß auch ein Parallelismus zwischen Präzipitingehalt und Menge des anaphylaktischen Immunkörpers besteht; wir begnügen uns hier, einfach darauf hinzuweisen, um später diesen Punkt ausführlicher zu besprechen.

γ) Noch eindeutiger waren die analogen Versuche mit dem Antirinderserum von Kaninchen 475. Es präzipitierte Vollserum vom Rinde in **2250-facher**, Globulinlösung in **750-facher** Verdünnung, gab aber mit Albuminlösung nur **Spuren von Trübung**, keine Präzipitate. Mit 1,0 vorbehandelte Meerschweinchen reagierten

auf Vollserum:

M. 20	0,5	Rinderserum	† 5'
„ 21	0,4	„	† 5'
„ 22	0,25	„	† 12'
„ 23	0,2	„	† 5'
„ 24	0,1	„	† 5'
„ 25	<b>0,05</b>	„	† 5'
„ 26	0,01	„	deutliche Symptome
„ 27	0,005	„	leichteste Symptome

## auf Globulinlösung:

M. 28	0,2	Rinderglobulin	† 5'
„ 29	0,1	„	† 5'
„ 30	0,05	„	schwere Symptome, erholt sich
„ 31	0,01	„	θ

## auf Albuminlösung:

M. 33	2,0	Albuminlösung	schwere Symptome, erholt sich
„ 35	1,0	„	deutliche Symptome
„ 36	0,5	„	deutliche Symptome, legt sich um, steht aber bald wieder auf
„ 37	0,2	„	θ
„ 38	0,1	„	θ

d) Die schönsten Beweise für die innigen Beziehungen zwischen präzipitierbarer Substanz und anaphylaktischem Antigen (toxischer Substanz) lieferten aber Versuche mit einem dritten Serum. Dasselbe stammte von einem Kaninchen 482, welches früher für die Gewinnung von Hammelblutambozeptor verwendet worden war, dann längere Zeit unbenutzt gestanden hatte und schließlich am 26. und 30. Mai je 5,0 Hammelserum intraperitoneal erhielt. Am 7. Juni wurde das Tier entblutet. Sein Serum gab nicht nur mit Hammelserum, sondern auch mit Seris von der Ziege, vom Rind, Schwein, Mensch, Pferd Niederschläge, nicht aber mit Hühnerserum. Das Genauere ergibt die Tabelle.

## Präzipitationswerte des Serums 482 für die Sera von:

Verdünnung	Hammel	Ziege	Rind	Schwein	Mensch	Pferd	Huhn
50	+++	+++	+++	+++	+++	++	θ
100	+++	+++	+++	+++	++	+	θ
500	+++	+++	+++	++	θ	θ	θ
1 000	+++	+++	+++	+			
2 000	+++	+++	+++				
3 000	+++	+++	+++	θ			
4 000	+++	+++	++	θ			
5 000	+++	+++	++	θ			
6 000	+++	++	+				
7 000	+++	++	+				
8 000	++	++	+				
9 000	+	+	+				
10 000	+	+	+				
12 000	+	+	+				
14 000	+	+	θ				
16 000	+	+	θ				
11 000	+	+	θ				
20 000	+	+	θ				

Nun wurden zahlreiche Meerschweinchen mit je 1,0 ccm dieses Serums intraperitoneal am 8. Juni vorbehandelt und



am 9. Juni mit verschiedenen Normalseris intravenös nachinjiziert.

a) Reinjektion von Hammelserum:

M.	80	0,1	Hammelserum iv.	†	5'
"	81	0,05	" "	†	5'
"	82	0,02	" "	†	5'
"	83	0,01	" "	†	15'
"	84	0,006	" "	†	5'
"	85	0,004	" "		leichte Symptome
"	86	0,002	" "	⊕	

b) Reinjektion von Ziegenserum:

M.	87	0,2	Ziegenserum iv.	†	5'
"	88	0,10	" "	†	5'
"	90	0,05	" "	†	5'
"	92	0,02	" "	†	5'
"	93	0,01	" "	†	5'
"	94	0,006	" "	†	5'
"	95	0,004	" "		deutl. Symptome
"	96	0,002	" "	⊕	

c) Reinjektion von Rinderserum:

M.	97	0,2	Rinderserum iv.	†	5'
"	98	0,1	" "	†	5'
"	99	0,02	" "	†	15'
"	100	0,01	" "		deutl. Symptome
"	101	0,006	" "	⊕	

d) Reinjektion von Schweineserum:

M.	102	1,0	Schweineserum iv.	†	5'
"	103	0,6	" "		schwere Symptome, erholt sich
"	104	0,2	" "		verzögerte, deutliche Symptome
"	105	0,1	" "		dgl.

e) Reinjektion von Menschenserum:

M.	106	1,0	Menschenserum iv.		schwere Symptome, erholt sich
"	107	0,6	" "		dgl.
"	108	0,2	" "		leichteste Symptome.

f) Reinjektion von Pferdeserum:

M.	110	2,0	Pferdeserum iv.		deutliche Symptome
"	111	1,0	" "		leichteste Symptome
"	112	0,6	" "	⊕	

g) Reinjektion von Hühnerserum:

M.	114	1,0	Hühnerserum iv.	⊕	
"	116	0,2	" "	⊕	

Am nächsten Tage erhielten alle überlebenden Tiere 0,2 Hammelserum in die andere Jugularvene, um refraktäre Individuen auszuschalten. Sie reagierten in folgender Art:

a) M.	85	0,2	Hammelserum	schwerste Symptome, erholt sich
	86	0,2	"	dgl.
b) "	95	0,2	"	+ 5'
	96	0,2	"	+ 5'
c) "	100	0,2	"	schwerste Symptome, erholt sich
	101	0,2	"	+ 5'
d) "	103	0,2	"	schwerste Symptome, erholt sich
	104	0,2	"	+ 5'
	105	0,2	"	+ 5'
e) "	106	0,2	"	+ 5'
	107	0,2	"	+ 5'
	108	0,2	"	+ 5'
f) "	110	0,2	"	+ 15'
	111	0,2	"	+ 5'
	112	0,2	"	+ 5'
g) "	114	0,2	"	+ 5'
	116	0,2	"	+ 5'

Ganz nach ihrer Präzipitierbarkeit mit Serum 482 hatten also die verschiedenen Normalsera auf mit 482 vorbehandelte Meerschweinchen toxisch gewirkt, am stärksten Hammelserum, dann in absteigender Reihenfolge Ziegen-, Rinder-, Schweine-, Menschen- und Pferdeserum. Das nicht-präzipitable Hühnerserum blieb ohne Effekt. Damit stand auch das neutralisierende Vermögen der verschiedenen Eiweißarten für den Antihammel-immunkörper in bestem Einklang; denn wie die zweite intravenöse Injektion von 0,2 Hammelserum lehrte, war der Immunkörper durch 0,002—0,004 Hammelserum abgeschwächt, durch die gleichen Dosen Ziegenserum nicht; vom Rinderserum neutralisierte erst 0,01, vom Schweineserum 0,6 partiell, von den restlichen Seris nicht einmal 1,0—2,0 ccm.

In parenthesi bemerkt, geht aus der vorstehenden Versuchsreihe auch hervor, daß bei quantitativem Arbeiten die Serumanaphylaxie ebensogut spezifisch ist, wie andere Immunreaktionen; diese Bemerkung wendet sich nur gegen Arthus, da die anderen Autoren ohnehin meist auf diesem Standpunkte stehen, allerdings ohne für die gegenteiligen Experimente die Erklärung der Nichtberücksichtigung zahlenmäßiger Versuche zu geben.

Nach allem bestand für uns kein Zweifel mehr, daß **präzipitable Substanz und anaphylaktisches Antigen, richtiger Eiweißantigen völlig identisch sind.**

Man kann aber für diese Behauptung noch ein direktes unwiderlegliches Argument beibringen. Ist sie nämlich richtig, so muß man mit sorgfältig gewaschenen spezifischen Prä-

zipitaten bei aktiv oder passiv anaphylaktischen Tieren die Reaktion auslösen können<sup>1)</sup>. Das letztere haben wir mehrmals versucht, stets mit Erfolg. Die verwendeten Sera sind aus den früheren Ausführungen meist schon bekannt.

a) Meerschw. 700 erhält am 20. VI. 1,0 Serum 492 (Antirinderserum) intraperitoneal; am 21. VI. bekommt es das Präzipitat, welches sich nach Vermengen von 1,0 dieses Serums mit 0,2 Rinderserum abgesetzt hatte, durch Abpipettieren, dreimaliges Waschen auf der Zentrifuge gereinigt, und in 2,0 ccm schwacher Sodalösung (für Kontrolle unschädlich) aufgelöst worden war, intravenös. Es verendet in 3'.

b) Meerschw. 701 erhält am 20. VI. 1,0 Serum 492 ip.; am 21. VI. die bei obigem Präzipitationsversuch abpipettierte Flüssigkeit (1,0 Serum 492 + 0,2 Rinderserum minus Präzipität); es zeigt kaum leichteste Symptome.

In anderen Fällen erweist sich nicht nur das Präzipitat hochtoxisch für hypersensible Tiere, sondern auch die nach Entfernung desselben restierende Flüssigkeit. Es hängt dies natürlich von den gegenseitigen Mengenverhältnissen von präzipitabler Substanz und Präzipitin ab; sind diese so beschaffen, daß noch bedeutende Mengen der ersteren ungefällt bleiben, so wird natürlich nicht nur der Niederschlag, sondern auch die noch antigenhaltige Flüssigkeit den Shock beim anaphylaktischen Tier hervorrufen.

Zum Beispiel:

1,0 Serum 489 (Antirinderserum) wird mit 0,2 Rinderserum versetzt, kommt auf 4<sup>h</sup> in den Thermostaten, sodann auf 16<sup>h</sup> in den Eiskasten. Die überstehende Flüssigkeit A wird abgehebert, der Niederschlag B gewaschen und in Sodalösung gelöst. Die Meerschweinchen 340 und 341 erhalten am 1. VII. je 1,0 Serum 489 ip.; 340 bekommt am nächsten Tag A, 341 B iv.; beide verenden in 3'.

Oder:

1,0 Serum 449 (Antimenschenserum) wird mit 0,2 Menschenserum versetzt und wie im vorhergehenden Versuch behandelt. Die Meerschweinchen 342 und 343 erhalten am 1. VII. je 1,0 Serum 449 ip., am 2. VII. bekommt 342 die überstehende Flüssigkeit A, 343 das gewaschene und gelöste Präzipitat B; beide gehen nach 5' typisch ein.

1) Die Präzipitate sind allerdings schon an sich toxisch für normale Tiere, aber wie später gezeigt werden wird, nur in geringem Grade; die höchst intensive Wirkung auf hypersensible Tiere beweist jedenfalls ihren Gehalt an freiem Eiweißantigen.

Geringe Mengen von präzipitabler Substanz bleiben wohl stets gelöst; sie reichen aber nicht immer zur Auslösung anaphylaktischer Symptome aus, besonders wenn die aktive oder passive Anaphylaxie, d. h. die Menge des selbstproduzierten oder zugeführten Immunkörpers beim Tiere nicht sehr hoch ist.

**Ist nun die präzipitable Substanz identisch mit dem anaphylaktischen Antigen, dann kann der freie (vom Serumspender losgelöste) anaphylaktische Immunkörper nichts anderes sein als das Präzipitin.**

Dafür läßt sich nun zunächst anführen, daß stark präzipitierende Sera viel Immunkörper gegen Eiweiß enthalten, schwach präzipitierende wenig. [Diese Tatsache konnte natürlich ohne vorausgegangene Untersuchung über die Wertbestimmung der Eiweißantikörper, wie wir sie in der vorliegenden Arbeit gaben, gar nicht mit Sicherheit eruiert werden.] Wir verfügen über so viele Beispiele, daß wir nur einige Exzerpte aus unseren Protokollen anführen wollen.

a) Serum vom Kaninchen 475 gibt mit Rinderserum bei **1 : 1250** noch Niederschläge. Sein Gehalt an anaphylaktischem Immunkörper erhellt aus folgender Bestimmung:

M. 20	am 4. V. je 1,0 Serum 475 i.p.	am 5. V. 0,5	Rinders. ip. iv.	† 5'
" 21		" 5. V. 0,4	" " "	† 5'
" 22		" 5. V. 0,25	" " "	† 12'
" 23		" 5. V. 0,2	" " "	† 5'
" 24		" 5. V. 0,1	" " "	† 5'
" 25		" 5. V. 0,05	" " "	† 5'
" 26		" 5. V. 0,01	" " "	deutl. Symptome
" 27		" 5. V. 0,005	" " "	leichteste Sympt.

b) Serum vom Kaninchen 500 gibt mit Rinderserum noch bei **1 : 1800** Niederschläge. 1,0 desselben enthielt so viel Immunkörper, daß 0,01 Rinderserum intravenös nach 24 Stunden tödlich war.

c) Serum von Kaninchen 454 lieferte mit Rinderserum nur in **50-facher** Verdünnung Niederschläge. Sein Gehalt an Antirindereiweiß war dementsprechend minimal:

M. 120	am 8. VI. 1,0 Serum 454 ip.	am 9. VI. 1,0 Rinderserum iv.,
" 121		schwere Sympt., <b>erholt sich</b>
" 122		am 9. VI. 0,4 Rinderserum iv., <b>keine Reaktion</b>
		am 9. VI. 0,2 Rinderserum iv., <b>keine Reaktion</b>

d) Serum von Kaninchen 482 lieferte mit Hammelserum 1:8000 Niederschläge. Immunkörperbestimmung:

M. 80	am 8. VI. 1,0 Serum 482 ip.	am 9. VI. 0,1 Hammelserum iv.	† 5'
" 81		" 9. VI. 0,05 "	† 5'
" 82		" 9. VI. 0,02 "	† 5'
" 83		" 9. VI. 0,01 "	† 15'
" 84		" 9. VI. 0,006 "	† 5'
" 85		" 9. VI. 0,004 "	leichte Symptome
" 86		" 9. VI. 0,002 "	θ

e) Serum von Kaninchen 455 reagiert mit dem zugehörigen Hühnerserum noch bei 1:500 unter Präzipitation. Immunkörper:

M. 180	am 18. VI. 1,0 Serum 455 ip.	am 19. VI. 0,3 Hühnerserum	† 5'
" 181		" 19. VI. 0,2 "	† 5'
" 182		" 19. VI. 0,1 "	† 5'
" 183		" 19. VI. 0,05 "	sehr verspätete schwere Symptome, erholt sich
" 184		" 19. VI. 0,02 "	sehr verspätete schwere Symptome, bald erholt
" 185		" 19. VI. 0,01 "	leichte Symptome
" 186		" 19. VI. 0,005 "	θ

f) Nach der dritten Methode (stufenweiser Antigenzusatz und Prüfung auf den Rest an Ueberempfindlichkeit) wurden, wie oben ausführlich wiedergegeben, geprüft: ein Hühnerantiserum von Kaninchen 455, ein Ziegenantiserum von Kaninchen 477 und ein Menschenantiserum von Kaninchen 423.

Dabei hatte sich das Serum 455 als stärkstes erwiesen (1,0 ccm durch 0,1 Hühnerserum nicht völlig abgesättigt!), das Serum 477 war etwas schwächer (1,0 Serum völlig neutralisiert durch 0,04 Ziegenserum), und 423 enthielt in 1,0 ccm so wenig Immunkörper, daß 0,008 Menschenserum zur Neutralisation ausreichten. Die drei Immunsera präzipitierten ihre zugehörigen Eiweißlösungen (Normalsera), wie folgt:

Verdünnung von	Hühnerserum (mit Serum 455)	Ziegenserum (mit Serum 477)	Menschenserum (mit Serum 423)
100	+++	+++	+++
200	+++	+++	++
400	+++	++	+
800	+++	+	+
1600	+++	+	+
3200	++	θ	θ
6400	+	θ	θ

g) Die beiden Menschenantisera von Kaninchen 401 und 449 (völlig gleichartig immunisiert!) präzipitierten Menschenserum ungleichmäßig, und zwar:

Verdünnung	Serum 401	Serum 449
50	+++	+++
250	+	+++
500	+	+++
1 000	⊖	+++
2 000	⊖	++
4 000	⊖	+
8 000	⊖	Spur
16 000	⊖	⊖

Die Bestimmung des anaphylaktischen Immunkörpers  
ergab:

für Serum 401:

M. 100	am 18. VI. 1,0 Serum 401 ip.	am 19. VI. 0,5	Menschenserum iv.	verspät. Sympt., † in 1 Stunde
" 101		" 19. VI. 0,2	" "	dgl.
" 102		" 19. VI. 0,1	" "	verspät. Sympt., erholt sich
" 103		" 19. VI. 0,08	" "	dgl.
" 104		" 19. VI. 0,05	" "	dgl.
" 105		" 19. VI. 0,04	" "	dgl.
" 106		" 19. VI. 0,02	" "	leichteste Sympt.
" 107		" 19. VI. 0,005	" "	⊖

für Serum 449:

M. 110	am 18. VI. 1,0 Serum 449 ip.	am 19. VI. 0,1	Menschenserum iv.	† 5'
" 111		" 19. VI. 0,08	" "	† 5'
" 112		" 19. VI. 0,05	" "	† 5'
" 113		" 19. VI. 0,04	" "	† 10'
" 114		" 19. VI. 0,035	" "	schwere Sympt., erholt sich
" 115		" 19. VI. 0,02	" "	dgl.
" 116		" 19. VI. 0,01	" "	leichte Sympt.
" 117		" 19. VI. 0,005	" "	Spur

Auch bei demselben Immuntier läßt sich zeigen, daß mit fortschreitender Immunisierung Präzipitin und anaphylaktischer Immunkörper gleichmäßig wachsen und abnehmen. So hatte Kaninchen 493 (immunisiert mit Schweineserum) beim ersten Aderlaß vom 13. Juni ein sehr schwach präzipitierendes Serum, mit 50-fach verdünntem Schweineserum entstanden nur Trübungen. Um diese Zeit war auch der Antikörper gegen Schweineeiweiß im Serum des Kaninchens recht spärlich. Mit 1,0 vorbehandelte Meerschweinchen reagierten nicht einmal auf 0,2 Schweineserum intravenös mit Exitus:

M. 160	am 18. III. 1,0 Serum 493 ip.	am 19. III. 0,2	Schweineserum iv.	schwere Sympt., erholt sich
" 161		" 19. III. 0,2	" "	dgl.
" 163		" 19. III. 0,01	" "	⊖

14\*

Beim zweiten Aderlaß vom 22. Juni präzipitierte das Serum von Kaninchen 493 Schweineserum noch in 1600-facher Verdünnung. Dementsprechend war 0,2 Schweineserum für mit 1,0 Serum 493 vorbehandelte Tiere letal.

M. 170 am 23. VI. 1,0 Serum 493 ip., am 24. VI. Schweineser., † in 5'. Weiter wurde nicht geprüft; sicher hätten noch weit kleinere Mengen ausgereicht.

Danach könnte man vermuten, daß Immunsera, die gar kein Präzipitin enthalten, d. h. vielmehr die korrespondierende Eiweißlösung nicht ausflocken, auch des anaphylaktischen Immunkörpers entbehren; man darf aber nicht vergessen, daß zwischen Eiweißantigen und Eiweißantikörper in vitro noch eine andere Reaktion möglich ist als die Entstehung eines sichtbaren Präzipitates, eine Reaktion, die nur indirekt durch die spezifische Deviation des Komplementes erkennbar wird (Moreschi). Nun hatten wir tatsächlich einmal ein Antischweineserum in Händen, welches mit Schweineserum auch in bloß 10-facher Verdünnung nicht einmal Trübung lieferte. Es stammte von Kaninchen No. 443, das am 2. Juni 1,0 Schweineserum subkutan, am 3. und 7. Juni je 2,0 Schweineserum intravenös erhalten hatte. Erster Probeaderlaß am 13. Juni. Auf anaphylaktischen Immunkörper geprüft, war aber das Resultat positiv:

M. 330	am 17. III. 1,0 Serum 443 ip.	am 18. III. 0,2 Schweines. iv.,	verspätete schwere S., erholt sich
„ 331		„ 18. III. 0,1 „ „	verspätete, deutliche Symptome
„ 332		„ 18. III. 0,05 „ „	dgl.
„ 333		„ 18. III. 0,02 „ „	dgl.
„ 334		„ 18. III. 0,01 „ „	leichte Symptome

Die Menge des Immunkörpers war allerdings minimal, da nicht einmal 0,2 akut tötete; das ging auch daraus hervor, daß sämtliche Tiere am 19. März nochmals 0,3 Schweineserum erhielten und ohne jede Reaktion blieben, da die Injektion am 18. März offenbar die geringen Antikörpermengen völlig neutralisiert hatte.

Dieses Serum 443 (erster Aderlaß) präzipitierte nun Schweineserum nicht, gab aber spezifische Komplementablenkung (s. die Tabelle auf p. 203).

Kaninchen 443 erhielt am 15. Juni neuerlich 2,0 Schweineserum intravenös und wurde am 20. Juni zur Ader gelassen. Das Serum von diesem zweiten Aderlaß präzipitierte Schweineserum noch in 1600-facher Verdünnung und anaphylaktisierte in Mengen von 1,0 derart, daß 0,2 und 0,1 ccm Schweineserum akut letal waren (weiter abwärts nicht versucht!).

Wir haben also in der Präzipitinreaktion ein einfaches und ausgezeichnetes Mittel, den Gehalt an anaphylaktischem Immunkörper schon in vitro vergleichsweise zu bestimmen.

Da wir wissen, daß das Präzipitin (= anaphylaktischem Immunkörper) in die Bildung des Präzipitates eingeht, so ergibt sich die Frage, ob man nicht durch Injektion der Präzipitate passive Anaphylaxie erzeugen kann. Sie beantwortet sich von selbst in negativem Sinne, wenn man bedenkt, daß das Präzipitat Antigen im Ueberschuß enthält. Es muß daher eine gegenseitige Absättigung im Organismus stattfinden und die mit Präzipitaten vorbehandelten Tiere können auf eine 24 Stunden später erfolgende Antigeninjektion nicht mehr reagieren.

Wir begnügen uns, anzuführen, daß etwa 15 in dieser Art angestellte Versuche die volle Bestätigung dieser Voraussetzung ergaben.

Die Identität von anaphylaktischem Immunkörper und Präzipitin läßt sich aber doch noch auf andere Art beweisen. Wir wissen, daß weiße Mäuse weder aktiv noch passiv gegen Eiweiß sensibilisiert werden können, d. h. sie bilden keinen Eiweißantikörper und können passiv zugeführten nicht verankern. Nun sind weiße Mäuse auch nicht imstande, Präzipitin zu bilden

0,1 ccm S.	443	+ 0,3 Schweines.	+ 0,05	Kompl.	(1 <sup>h</sup> bei 37°)	+ 0,002	ia.	Hammelhblutamboz.	Hammelerythroc.	Hemmung.
0,1	"	443 + 0,3 Pferdes.	+ 0,05	"	(1 <sup>h</sup> " 37°)	+ 0,002	"	+	+	Lyse.
0,1	"	443 + 0,3 Menschens.	+ 0,05	"	(1 <sup>h</sup> " 37°)	+ 0,002	"	+	+	Lyse.
0,1	"	443 + 0,3 Ziegens.	+ 0,05	"	(1 <sup>h</sup> " 37°)	+ 0,002	"	+	+	Lyse.
0,1	"	443 + 0,3 Taubens.	+ 0,05	"	(1 <sup>h</sup> " 37°)	+ 0,002	"	+	+	Lyse.

(Alle Kontrollen angestellt!)



(12 negative Versuche mit verschiedenen Seris). In einer solchen Unfähigkeit, Präzipitin zu bilden und passiv zu verankern, dürfte auch die Erklärung der Tatsache zu suchen sein, daß manche Meerschweinchen weder aktiv noch passiv anaphylaktisch zu machen sind. Das ist natürlich nur eine Vermutung, bei den weißen Mäusen ist es jedoch gewiß, daß Fehlen der Präzipitinbildung und der Serumanaphylaxie koinzidieren.

---

Es ist hier überflüssig, die vorstehenden Versuche zu einer zusammenhängenden Darstellung des Wesens der Anaphylaxie zu verwerten; dieser Mühe sind wir durch Friedbergers geistvolle Ausführungen (siehe diese Zeitschrift, I. Teil, Bd. 2) enthoben. Die vorliegende Arbeit bildet gewissermaßen den experimentellen Kommentar zu der Hypothese dieses Autors, wonach die anaphylaktische Reaktion nichts anderes ist, als die im Organismus zwischen sessilem Präzipitin der giftempfindlichen Zelle und präzipitabler Substanz sich vollziehende Reaktion. Durch das Studium des im Serum frei enthaltenen anaphylaktischen Immun- oder Eiweißantikörpers konnte eben der Beweis hierfür leichter erbracht werden, als durch die Analyse der aktiv anaphylaktischen Eiweißimmunität.

Nur ein Punkt erheischt noch eine genauere Erörterung. Wir wissen nunmehr, daß die Verbindung des an der Zelle verankerten Präzipitins mit dem zugehörigen Eiweiß auf den Organismus giftig wirkt. Wie verhält es sich aber, wenn Präzipitin und präzipitabile Substanz in vitro aufeinander wirken? Da müßte doch auch ein Gift entstehen, d. h. das sichtbare Produkt der Reaktion zwischen Eiweißantigen und Eiweißantikörper, das Präzipitat sollte auf normale Tiere toxisch wirken, bzw. den anaphylaktischen ähnliche Symptome hervorrufen.

Das Präzipitin besitzt Affinität zur präzipitablen Substanz; es hat aber noch eine zweite haptophore Gruppe, die mit den Organzellen in Verbindung tritt. Die Existenz dieser cytophilen Gruppe erhellt aus der Tatsache, daß passiv einverleibtes Präzipitin etwa in 4 Stunden verankert wird, sie wird

weiter gestützt durch die oben zitierten Bindungsversuche. Läßt man in vitro Präzipitin und Eiweißantigen aufeinander einwirken, so verbinden sie sich zum Gift; injiziert man die Verbindung, so muß die unbesetzte cytophile Gruppe des Präzipitins zur Verankerung gelangen, d. h. die Vergiftung eintreten. Das kann man nun interessanterweise wirklich zeigen; allerdings sind die Symptome nach Injektion gelöster Präzipitate nicht stürmisch, es tritt kein Exitus ein; die Tiere zeigen aber etwa nach 10—15 Minuten Dyspnoë, werden somnolent, taumeln, bekommen Krämpfe und erholen sich schließlich nach einiger Zeit völlig. Die Ursache dieses protrahierten Verlaufes ist klar: die Verankerung der cytophilen Gruppe des Präzipitins erfolgt nur allmählich, wie wir gezeigt haben, erst in 4 Stunden völlig, daher gelangt das eingeführte fertige Gift nur langsam in Berührung mit den Zellen, der schwere Shock bleibt aus. Lassen wir aber zuerst das Präzipitin verankern und injizieren dann das Eiweißantigen, so wird dieses sofort mit dem bereits sessilen Präzipitin an allen Zellen unter Giftbildung reagieren, es entsteht der typische Shock.

**Versuche über Giftwirkung der Präzipitate für normale Tiere:**

- a) 1,0 Serum 449 + 0,2 Menschenserum bleibt 4 Stunden bei 37°, sodann bis zur Sedimentierung im Eiskasten. Die überstehende Flüssigkeit A wird abpipettiert, das Präzipitat B gewaschen und in schwacher Sodalösung gelöst.  
M. 170 erhält B; verspätete Reaktion, fällt um, tot nach mehreren Stunden.  
M. 171 erhält A; keine Reaktion.
- b) 2,0 Serum 449 + 0,4 Menschenserum. Trennung in A und B wie vorher.  
M. 172 erhält B iv.; verspätete Reaktion, fällt um, somnolent.  
„ 173 „ A „ keine Reaktion.
- c) 1,0 Serum 449 + 0,2 Menschenserum. Trennung in A und B.  
M. 174 erhält B iv.; verspätete Reaktion, fällt um.  
„ 175 „ A „ keine Reaktion.
- d) 2,0 Serum 449 + 0,4 Menschenserum. A und B.  
M. 176 erhält B; schwere Dyspnoë, fällt um, tot nach mehreren Stunden.

- e) 1,0 Serum 443 + 0,2 Schweineserum. A und B.  
 M. 177 erhält A iv.; keine Reaktion.  
 „ 178 „ B „ schwerste Symptome, erholt sich.
- f) 2,0 Serum 443 + 0,4 Schweineserum.  
 M. 179 erhält A iv.; keine Reaktion.  
 „ 180 „ B „ leichte Symptome.
- g) 1,0 Serum 489 + 0,2 Rinderserum.  
 M. 181 erhält B iv.; schwerste Symptome, erholt sich.  
 „ 182 „ A „ keine Reaktion.
- h) 2,0 Serum 489 + 0,4 Rinderserum.  
 M. 183 erhält B iv.; schwerste Symptome, erholt sich.

In anderen Fällen wirkten auch die überstehenden Flüssigkeiten schwach giftig, konform der Tatsache, daß Eiweißantigen und Eiweißantikörper nicht immer in Form des Präzipitates sich verbinden, sondern auch in Lösung bleiben können (Moreschi).

Diese Giftigkeit der Präzipitate steht nicht im Widerspruche mit der Unschädlichkeit der Gemische von Antiserum und Antigen (s. oben III.); diese ist nämlich nur dann vorhanden, wenn man sofort nach dem Vermengen injiziert und wenn die Avidität des Präzipitins so gering ist, daß nicht augenblickliche Fällung eintritt. Läßt man die Mischungen stehen, bis Präzipitation eintritt, oder arbeitet man mit derart hochwertigen Immunseris, daß sofortige Ausflockung eintritt, so vermögen auch die Gemenge ähnliche Symptome wie gelöste Präzipitate hervorzubringen, etwas schwächer allerdings, weil das entstandene Gift nicht (durch Soda) gelöst ist, sondern erst im Blute des Empfängers in reaktionsfähige Form gebracht werden muß, z. B.:

1,0 Serum 449 + 0,2 Menschenserum sofort nach dem Mischen intravenös injiziert Meersch. 129; verspätete schwere Reaktion, somnolent, taumelt, fällt um, erholt sich.

#### Schlußfolgerungen.

- 1) Nur die Globuline, nicht aber die Albumine artfremder Sera vermögen die Bildung von spezifischem Eiweißantikörper hervorzurufen.

2) Die Menge des in einem Immunserum vorhandenen Eiweißantikörpers läßt sich am Meerschweinchen durch passive Uebertragung mit hinreichender Genauigkeit quantitativ feststellen.

3) Der Gehalt einer Eiweißlösung (eines artfremden Serums, einer Albumin-, einer Globulinlösung) an Eiweißantigen steht in völligem Parallelismus zu dem Gehalt an präzipitabler Substanz.

4) Umgekehrt entspricht die Menge an anaphylaktischem Immunkörper dem Gehalte der betreffenden Immunsera an Präzipitin.

5) Die Verankerung des passiv einverleibten anaphylaktischen Immunkörpers erfolgt allmählich und ist bei intravenöser Injektion von Meerschweinchen in etwa 4 Stunden beendet.

6) Die Präzipitate, welche bei Einwirkung von Eiweißantigen und Antikörper in vitro entstehen, sind giftig. Dieses Gift löst die anaphylaktischen Symptome aus. Bei Injektion der fertigen Verbindung (gelöstes Präzipitat) verläuft die Vergiftung wegen der allmählichen Verankerung an die Organzellen langsam. Bei präparatorischer Verankerung der cytophilen Giftkomponente (Präzipitin) und erst dann erfolgender Antigenzufuhr vollzieht sich die Vergiftung wegen der raschen Verbindung von Präzipitin und präzipitabler Substanz momentan in Form des anaphylaktischen Shocks.

7) Tiere (weiße Mäuse), welche aktiv nicht anaphylaktisierbar sind, können auch durch passive Zufuhr des in einem zweiten Tiere gebildeten Immunkörpers nicht sensibilisiert werden, da ihnen der Rezeptor für die cytophile Gruppe des Präzipitins fehlt; sie sind natürlich auch nicht imstande, Präzipitine zu bilden.

8) Nach allem scheint die Ansicht Friedbergers, daß die Anaphylaxie eine Vergiftung durch

eine in den Organzellen erfolgende Präzipitinreaktion ist, begründet.

Anmerkung. Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit bekamen wir die Mitteilung Friedemanns (Bd. 2 dieser Zeitschrift) zu Gesicht. In vielen Punkten befindet sie sich in Uebereinstimmung mit dem experimentellen Teil unserer Untersuchungen, so z. B. was die Giftigkeit der Präzipitate anbelangt. In anderen Punkten ergeben sich Differenzen, so z. B. in der Angabe, daß das Gift aus dem Immuserum stammt, welches auch die Hauptmasse der Präzipitate bei der Präzipitinreaktion liefert. Wir sahen vielmehr, daß die Präzipitate reich an Antigen sind. Ferner fanden wir die Komplementwirkung in unseren Meerschweinchenversuchen nicht ausgesprochen, da die Gemische nicht stärker wirkten als die Präzipitate allein, ja sogar schwächer, wenn man die Präzipitate durch Alkali in Lösung brachte. Auch wurde durch reichlichen Komplementzusatz die Wirkung der Präzipitate nicht verstärkt, wie Versuche beweisen, welche wir wegen ihres negativen Resultates nicht angeführt haben. In der theoretischen Auffassung weicht Friedemann von Friedberger und uns nicht unerheblich ab, und wird sich noch Gelegenheit bieten, diese Differenzen an geeignetem Orte zu besprechen.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der experimentellen Abteilung des Instituts für Hygiene und experimentelle Therapie zu Marburg.]

### **Ueber den Nachweis sehr kleiner Mengen des Diphtheriegiftes.**

Von Professor Dr. Paul H. Römer.

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. Juli 1909.)

Die intrakutane Injektion von Tuberkulin erzeugt beim tuberkulösen Meerschweinchen, wie ich zuerst gezeigt habe, eine außerordentlich charakteristische und spezifische Reaktion. Genaueres über die bisherige Verwertung dieser Intrakutanreaktion werden demnächst erscheinende Arbeiten von Römer und Joseph<sup>1)</sup> bringen. Bei der deutlichen Giftwirkung, die dem Diphtheriegift auf das subkutane Zellgewebe zukommt, lag es nahe, zu prüfen, ob nicht auch intrakutan eine charak-

1) Römer und Joseph, Prognose und Inkubationsstadium bei experimenteller Meerschweintuberkulose. Berl. klin. Wochenschr., 1909, No. 28. — Dieselben, Zur Verwertung der intrakutanen Reaktion auf Tuberkulin. Beiträge zur Klinik der Tuberkulose und spezifischen Tuberkuloseforschung, Bd. 13.

teristische Diphtheriegiftwirkung sich feststellen läßt. Solche seit längerer Zeit von mir mit positivem Ergebnis ausgeführte Versuche haben zu dem Resultat geführt, daß es mit Hilfe der Intrakutanmethode gelingt, minimale Mengen von Diphtheriegift nachzuweisen.

Die Reaktion bei dieser Anwendungsform des Diphtheriegiftes besteht bei ganz geringen Dosen in einer sich über 3—4 Tage erstreckenden leichten ödematösen Schwellung und Rötung, welche von Haarausfall über der geimpften Stelle schließlich gefolgt ist. Bei mittleren Dosen zeigt sich eine kleine Nekrose auf der in den ersten Tagen als Quaddel imponierenden Reaktionsstelle. Bei größeren Dosen endlich, die etwa  $\frac{1}{50}$  der tödlichen Minimaldosis entsprechen, kommt es rasch zu einer bereits am 3., selbst am 2. Tage schon deutlichen oberflächlichen Hautnekrose.

Es liegt die Frage nahe, ob diese Giftwirkung der Bouillonkulturfiltrate von Diphtheriebacillen auf die Haut von Meerschweinchen durch das gleiche Gift verursacht wird, das bei subkutaner Injektion genügend großer Dosen den charakteristischen Diphtherietod verursacht. Wenn die intrakutane Giftwirkung eine Folge des echten Diphtheriegiftes war, dann mußte eine quantitative Giftwertbestimmung durch intrakutane Injektion annähernd zum gleichen Ergebnis führen, wie eine subkutan ausgeführte quantitative Giftprüfung.

Die prinzipielle Entscheidung dieser Frage versuchte ich mit Hilfe zweier, in ihrem direkten Giftwert für Meerschweinchen außerordentlich differierender Gifte. Das Diphtheriegift Ballon II stammt aus dem Jahre 1898 und hatte früher einen Giftwert von etwa 25 000 + M, d. h. 1 ccm war die tödliche Dosis für 25 000 g Meerschweinchen. Eine erneute Auswertung im Mai dieses Jahres ergab nun eine enorme Abschwächung des direkten Giftwertes, wie nachfolgende Tabelle zeigt (s. Tabelle I auf p. 210).

Der direkte Giftwert hat sich also erheblich vermindert, 1 ccm enthält nur noch 100 + M. Eine deutliche, eben noch erkennbare subkutane Giftwirkung ließ sich noch mit 0,2 ccm, also etwa  $\frac{1}{15}$  der tödlichen Minimaldosis nachweisen.

Die intrakutane Prüfung wurde in der Weise vorgenommen, daß gesunde Meerschweinchen an beiden Seiten von Brust und Bauch mit Calciumhydrosulfid in schonender Weise depiliert

Tabelle I.

Meerschweinchen No.	Gewicht g	Gift-dosis ccm	Also geprüft auf	Ergebnis
7829	345	0,06	5750 + M	glatt
7828	370	0,08	4500 + "	"
7822	380	0,1	3800 + "	Spur Oedem?
7809	370	0,2	1850 + "	geringes Infiltrat
7804	340	0,4	850 + "	deutliches Infiltrat
7925	225	0,5	450 + "	" " Nekrose
7806	380	0,6	633 + "	starkes Infiltrat, Nekrose
7808	340	0,8	450 + "	" " "
7689	530	1,0	330 + "	" " "
7840	350	1,25	280 + "	" " "
7839	325	1,5	216 + "	" " enorme Nekrose
7825	350	1,75	200 + "	" " "
7927	230	2,0	115 + "	" " "
7823	350	2,25	150 + "	" " "
7838	350	2,5	140 + "	" " "
7837	320	2,75	115 + "	" " "
7842	420	3,0	140 + "	" " enorme Nekrose, † nach 30 Tagen
7841	410	3,25	126 + "	" " † nach 8½ Tagen
7844	350	3,5	100 + "	" " † nach 4 Tagen; charakteristischer Diphtheriebefund.

und dann — möglichst entfernt voneinander — links vorn, links hinten, rechts vorn und rechts hinten ihnen 0,1 ccm der nachfolgenden Giftverdünnungen intrakutan und zwar möglichst oberflächlich injiziert wurden. Das Ergebnis der Prüfung war folgendes (s. Tabelle II auf p. 211).

Wir bekommen also eine ganz unzweifelhafte Giftwirkung bei 0,1 ccm  $\frac{1}{20}$  Verdünnung des geprüften Giftes. Da 1 ccm des unverdünnten Giftes nach obiger Tabelle 100 + M enthielt, würden 0,1 ccm  $\frac{1}{20} = 0,5 + M$  enthalten. Oder anders ausgedrückt: intrakutan ruft noch  $\frac{1}{500}$  der tödlichen Minimaldosis für ein Meerschweinchen von mittlerem Gewicht eine nicht zu übersehende zweifellose Giftwirkung hervor.

Es ist nach meinen bisherigen Erfahrungen ohne Einfluß auf das Resultat, ob man nur je eine Intrakutanprüfung an einem Meerschweinchen vornimmt, oder wie im oben verzeichneten Fall mehrere Prüfungen an ein und demselben Tier, vorausgesetzt, daß die einem Tier injizierten Gift Dosen nicht zu sehr voneinander differieren und die Injektionsstellen nicht zu dicht zusammenliegen.

Tabelle II.

Meer- schw. No.	Ge- wicht g	Gift-dosis	Folgen der Injektion nach			
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	5 × 24 <sup>h</sup>
8071	325	0,1 ccm $\frac{1}{500}$ l. v.	0	0	0	0
		0,1 ccm $\frac{1}{100}$ l. h.	0	0	0	0
		0,1 ccm $\frac{1}{50}$ r. v.	Spur Schwel- lung	geringe Schwellung	geringe Schwellung	Haar- ausfall
		0,1 ccm $\frac{1}{20}$ r. h.	geringe Schwellung	geringe Schwellung und Rötung	Schwellung und Ver- färbung	Spur Nekrose
8072	300	0,1 ccm $\frac{1}{10}$ l. v.	geringe Schwellung und Rötung; Spur Ver- färbung	starke Ver- färbung	derselbe Be- fund	kleine Nekrose
		0,1 ccm $\frac{1}{5}$ l. h.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
		0,1 ccm $\frac{1}{2}$ r. v.	Quaddel	Quaddel mit beginnender Nekrose	dgl.	starke Nekrose
		0,1 ccm un- verdünnt r. h.	Quaddel mit kleinen Blut- extravasaten	Quaddel mit Nekrose	dgl.	dgl.

Ein weiteres Gift, das mir für diese Versuche zur Verfügung stand, war das Filtrat einer vom 27. III. bis 6. IV. 1909 gut gewachsenen Diphtheriebouillonkultur, das durch Zusatz von 0,4 Proz. Karbolsäure konserviert war. Ich nenne es im folgenden Diphtheriegift vom 6. IV. 09. Die direkte Giftprüfung durch subkutane Injektion ergab folgendes:

Tabelle III.

Meer- schweinchen No.	Ge- wicht g	Gift- dosis ccm	Also geprüft auf	Ergebnis
7944	190	0,0004	475 000 + M	glatt
7843	300	0,001	380 000 + "	"
7945	200	0,0006	333 000 + "	"
7946	200	0,0008	250 000 + "	Spur Infiltrat
7947	200	0,001	200 000 + "	geringes Infiltrat, kleine Nekrose
7851	375	0,003	125 000 + "	mäßiges Infiltrat, Nekrose
7948	200	0,002	100 000 + "	starkes " "
7848	390	0,005	78 000 + "	" " "
7950	190	0,004	47 500 + "	" " "
7951	190	0,006	31 600 + "	† nach 10 Tagen
7952	200	0,008	25 000 + "	† " 8 $\frac{1}{2}$ " "
7846	390	0,02	19 500 + "	† " 60 Stunden
7953	190	0,01	19 000 + "	† " 43 " "



Es enthielt somit 1 ccm des Diphtheriegiftes vom 6. IV. 09 etwa 22 000 + M. Die Intrakutanprüfung, in der gleichen Weise wie oben ausgeführt, ergab folgendes:

Tabelle IV.

Meer- schw. No.	Ge- wicht g	Giftdosis intrakutan	Folgen der Injektion nach			
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	5 × 24 <sup>h</sup>
8089	250	0,1 ccm $\frac{1}{50000}$ l. v.	0	0	0	0
		0,1 ccm $\frac{1}{10000}$ l. h.	0	Spur Rö- tung	Spur Verfär- bung	Spur, Haar- ausfall
		0,1 ccm $\frac{1}{5000}$ r. v.	Verfär- bung	deutliche Verfärbung	derselbe Be- fund	Geringe Ne- krose
		0,1 ccm $\frac{1}{2000}$ r. h.	dgl.	leichte Quad- del	Quaddel mit Spur Ne- krose	deutliche Nekrose
8073	250	0,1 ccm $\frac{1}{1000}$ l. v.	Quaddel	Quaddel mit Nekrose	derselbe Be- fund	starke Ne- krose
		0,1 ccm $\frac{1}{500}$ l. h.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
		0,1 ccm $\frac{1}{200}$ r. v.	starke Quaddel	starke Quad- del + Ne- krose	starke Ne- krose	dgl.
		0,1 ccm $\frac{1}{100}$ r. h.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.

Eine deutliche intrakutane Giftwirkung erhielt ich also eben noch mit 0,1 ccm  $\frac{1}{5000}$  des geprüften Giftes. Da 1 ccm 22 000 + M enthielt, entspricht die intrakutan wirksame Minimaldosis 0,45 + M. Oder anders ausgedrückt: die intrakutan wirksame Minimaldosis entspricht ungefähr  $\frac{1}{500}$  der subkutan tödlichen Minimaldosis.

Wir kommen also bei der quantitativen Auswertung dieser beiden in ihrem Giftwert so stark differierenden Gifte zu genau dem gleichen Ergebnis für das Verhältnis von subkutanem und intrakutanem Giftwert.

Bei einem dritten Gift habe ich den umgekehrten Weg eingeschlagen, indem ich versuchte, aus der intrakutan wirksamen Minimaldosis die subkutan wirksame Minimaldosis zu berechnen. Ich benutzte dazu das Diphtheriegift Ballon 7, das seit mehreren Jahren in unserem Institute aufbewahrt wird und bereits in einer früheren Arbeit von mir beschrieben

wurde<sup>1)</sup>. Das Gift hatte vor 5 Jahren einen direkten Giftwert von 1 ccm = 250 000 + M. In jedem der folgenden Jahre von neuem geprüft, erwies sich der Giftwert bisher absolut konstant, so daß wir ein Gift vor uns zu haben glaubten, das in seinem direkten Giftwert keine Abschwächung mehr erfahren würde. Von dieser Voraussetzung ausgehend, wurde auch die intrakutane Tuberkulinprüfung ausgeführt mit folgendem Ergebnis:

Tabelle V.

Meer- schw. No.	Ge- wicht g	Giftosis intrakutan	Erfolg der Injektion nach			
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	5 × 24 <sup>h</sup>
8119	270	0,1 ccm $\frac{1}{200000}$ l. v.	0	0	0	0
		0,1 ccm $\frac{1}{100000}$ l. h.	0	0	0	0
		0,1 ccm $\frac{1}{80000}$ r. v.	0	0	0	0
		0,1 ccm $\frac{1}{60000}$ r. h.	0	0	0	0
8079	250	0,1 ccm $\frac{1}{40000}$ l. v.	0	0	0	0
		0,1 ccm $\frac{1}{30000}$ l. h.	Spur Verfärbung	Spur Verfärbung	0	0
		0,1 ccm $\frac{1}{10000}$	Verfärbung	Verfärbung mit kleiner Nekrose	Nekrose	Nekrose
		0,1 ccm $\frac{1}{5000}$	Verfärbung u. Schwellung	Verfärbung u. mäßige Nekrose	starke Nekrose	starke Nekrose

Die intrakutan wirksame Minimaldosis entsprach also etwa  $\frac{1}{100000}$  ccm. Falls auch bei diesem Gift das gleiche Verhältnis zwischen intrakutaner und subkutaner Giftwirkung bestand, entsprach demnach  $\frac{1}{100000}$  ccm =  $\frac{1}{2}$  + M, bzw. 1 ccm des Giftes würde 50 000 + M entsprochen haben. Diese Berechnung stimmt aber nicht zu unserer Annahme, daß das Gift früher 250 000 + M pro 1 ccm enthielt und bei seiner großen Konstanz im Giftwert auch jetzt vermutlich noch die gleiche Giftmenge pro 1 ccm enthalten würde. Wir nahmen deshalb eine erneute Prüfung des Giftes durch subkutane Injektion vor mit folgendem Ergebnis:

1) Römer, Ueber dialysiertes Diphtheriegift. Berl. klin. Wochenschr., 1904, No. 9.

Tabelle VI.

Meer- schwein- chen No.	Ge- wicht g	Giftosis ccm	Also geprüft auf	Ergebnis
8061	270	0,00025	1 080 000 + M.	glatt
8062	260	0,0005	1 040 000 + M.	geringes Infiltrat
8063	245	0,00075	326 000 + M.	mäßiges Infiltrat, Nekrose, Lähmung nach 19 Tagen
8064	240	0,001	240 000 + M.	mäßiges Infiltrat, Nekrose, Lähmung nach 18 Tagen
8065	260	0,00125	200 000 + M.	mäßiges Infiltrat, Nekrose, Lähmung nach 28 Tagen
8066	240	0,0015	160 000 + M.	starkes Infiltrat, Nekrose, Lähmung nach 18 Tagen, † nach 30 Tagen
8067	245	0,00175	140 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, Lähmung nach 18 Tagen, † nach 31 Tagen
8068	260	0,002	130 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, Lähmung nach 26 Tagen
8080	240	0,0025	100 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, Lähmung nach 18 Tagen, † nach 23 Tagen
8089	240	0,00275	90 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, Lähmung nach 14 Tagen, † nach 16 Tagen
8085	240	0,003	80 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, Lähmung nach 14 Tagen, † nach 16 Tagen
8100	230	0,00325	70 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, † nach 5 Tagen (nicht an Diphtherie, Bluterguß)
8102	230	0,0035	60 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, † nach 7 1/2 Tagen
8105	240	0,004	60 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, † nach 7 1/2 Tagen
8130	230	0,0041	56 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, † nach 5 1/2 Tagen
8121	240	0,0042	57 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, † nach 5 1/2 Tagen
8126	250	0,0045	53 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, † nach 4 Tagen
8132	250	0,00475	52 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, † nach 48 Stunden
8133	250	0,005	50 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, † nach 46 Stunden
8134	250	0,0055	45 000 + M.	sehr starkes Infiltrat, Nekrose, † nach 44 Stunden

Die subkutane Giftprüfung ergab, daß in der Tat eine erhebliche Abschwächung gegen unser Erwarten, aber entsprechend dem Ergebnis der intrakutanen Giftprüfung stattgefunden hatte. 0,0045 ccm repräsentieren nunmehr die töd-

liche Minimaldosis für ein Meerschweinchen von 250 g. 1 ccm des Giftes enthält also ungefähr  $53\,000 + M$ . Das ist ziemlich genau derselbe Wert, den wir auf Grund der intrakutanen Giftprüfung berechnet hatten.

Es ist nach vorstehenden Versuchsreihen kein Zweifel, daß die intrakutane Giftwirkung auf das echte Diphtheriegift zu beziehen ist, das, in geeigneter Dosis subkutan injiziert, den typischen Diphtherietod erzeugt. Bemerkenswert scheint mir nun vor allem, daß man mit Hilfe der intrakutanen Injektionsmethode so geringe Mengen von Diphtheriegift nachweisen kann, bei den geprüften Giften ziemlich gleichmäßig  $\frac{1}{2} + M$ , also etwa  $\frac{1}{500}$  der tödlichen Minimaldosis.  $\frac{1}{250}$  der tödlichen Minimaldosis erzeugt jedenfalls eine so charakteristische Giftwirkung in der Haut, daß sie auch von dem Ungeübten nicht übersehen werden könnte. Da wir bei der bisherigen subkutanen Prüfung zur Erkennung der geringsten Giftwirkung lediglich auf die Ermittlung eines entstandenen Oedems durch Palpation hingewiesen waren, und auf diese Weise es höchstens gelang, bis zu  $\frac{1}{15}$  der tödlichen Minimaldosis nachzuweisen, müssen wir in der intrakutanen Injektionsmethode eine Methode begrüßen, die erheblich kleinere Mengen Diphtheriegift uns noch erkennbar macht. Es scheint mir das beachtenswert für mancherlei Fragen. Ich erinnere nur an die Frage des Diphtheriegiftnachweises im Blute diphtheriekranker Menschen.

Wir selbst haben inzwischen diese intrakutane Diphtheriegiftinjektionsmethode mit Erfolg verwertet zum Nachweis kleinster Mengen Diphtherieantitoxins und haben weiter durch intrakutane Injektionen von Diphtheriegift- und Diphtheriegegengiftmischungen eine sehr einfache, Tieropfer vermeidende Bewertungsmethode des Diphtherieserums kennen gelernt. In Gemeinschaft mit Dr. S a m e s werde ich über diese Versuchsergebnisse, mit deren Zusammenstellung wir zurzeit beschäftigt sind, in Bälde berichten.

Bisher konnten wir vom Tetanusgift bedeutend geringere Mengen nachweisen, als vom Diphtheriegift. Ich will das an einem Beispiel klar machen, wobei ich von dem von uns am wirksamsten gefundenen Diphtheriegift und Tetanusgift ausgehe. 1 ccm unserer wirksamsten, nicht künstlich konzentrierten

flüssigen Diphtheriegifte enthielt 250 000 + M., d. h. 0,001 ccm enthielt die tödliche Dosis für ein Meerschweinchen von mittlerem Gewicht. Mit Sicherheit gelang es, durch Ermittlung des entstandenen subkutanen Oedems, höchstens  $\frac{1}{15}$ — $\frac{1}{20}$  dieser Dosis nachzuweisen, also im besten Falle 0,00005 ccm. Unsere wirksamsten flüssigen Tetanusgifte enthalten in 1 ccm 4 Millionen + Ms., d. h. für eine Maus von 16 g wird die tödliche Minimaldosis repräsentiert durch 0,000004 ccm. Die eben noch erkennbare tetanuserzeugende Minimaldosis entspricht in der Regel  $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{7}$  der tödlichen Minimaldosis, im vorstehend angenommenen Fall also = 0,000007 ccm.

Durch intrakutane Diphtheriegiftprüfung ist es uns nunmehr möglich,  $\frac{1}{250}$ — $\frac{1}{500}$  der subkutan tödlichen Dosis zu erkennen, und das würde in dem oben angenommenen Falle entsprechen 0,000002 ccm. Wir kommen also in der Möglichkeit des Nachweises kleinster Mengen des Diphtheriegiftes dicht an die des Tetanusgiftes heran.

#### Zusammenfassung.

- 1) Intrakutan injiziert, hat das Diphtheriegift charakteristische Giftwirkung.
- 2) Zur Erzeugung eines deutlichen Effektes mit intrakutaner Injektion genügt  $\frac{1}{250}$ — $\frac{1}{500}$  der subkutan tödlichen Minimaldosis.
- 3) Die intrakutane Giftwirkung ist verursacht durch das echte Diphtheriegift.
- 4) Die nachgewiesene Möglichkeit, kleinste Mengen von Diphtheriegift mit Hilfe der Intrakutanmethode nachweisen zu können, macht dieselbe einerseits vielleicht für die Beantwortung mancher klinischer Fragen, sicherlich für experimentelle Diphtheriegift- und Diphtheriegegengiftstudien sehr geeignet.

#### Druckfehlerberichtigung.

In der Arbeit Kraus und Fukuhara Heft 1, p. 36, soll statt 1:200 (Tabelle II) 1:2000 stehen.

# Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originala. Bd. III. No. 3.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Hygienischen Institut der Universität Graz.]

## Weitere Aviditätsstudien an Agglutininen.

### III.—VI. Mitteilung.

Von Dr. Bruno Busson, Prof. P. Th. Müller und Dr. Aug. Rintelen.

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. Juli 1909.)

- I. Einleitung. Von Prof. Paul Th. Müller.
- II. Ueber den Zusammenhang von Agglutinationstiter und Avidität bei der Immunisierung mit Typhusbacillen. Mit 6 Kurven im Text. Von Dr. Bruno Busson.
- III. Aviditätsstudien am Serum Typhuskranker. Von Dr. August Rintelen.
- IV. Aviditätsstudien an schwer agglutinierbaren Typhusbacillen. Von Prof. Paul Th. Müller.

#### I. Einleitung.

Von Prof. Paul Th. Müller.

In meinen „Aviditätsstudien“<sup>1)</sup> habe ich zu zeigen versucht, daß im Laufe der Immunisierung eine Aviditätssteigerung der produzierten Antikörper — speziell der Agglutinine — eintritt. Da mit der Zahl der Einspritzungen in der Regel ein Anwachsen des Seruntiters stattzufinden pflegt, so ließ sich die Tatsache auch so darstellen, daß mit steigender Wertigkeit der Sera eine Zunahme der Aviditäten — gemessen durch die Absorptionsquotienten — stattfindet.

Bei einer eingehenden Diskussion der Frage, womit diese Aviditätssteigerung der produzierten Agglutinine wohl zusammenhängen dürfte, ergab sich die Vermutung, daß die Aviditäten in direkter Beziehung zu der Intensität der Antikörperproduktion<sup>2)</sup> stehen dürften,

1) Arch. f. Hygiene, Bd. 64; Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, 1908.

2) Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei bemerkt, daß „Intensität der Antikörperproduktion“ begrifflich nicht verwechselt werden darf mit „Höhe des Seruntiters“, wenn auch beide Größen natürlich miteinander zusammenhängen und vielfach miteinander parallel gehen.

und ich versuchte, diese Vermutung durch eine Reihe von Beobachtungen und Ueberlegungen zu stützen.

Der leitende biologische Gedanke, der mich zu dieser Annahme bewog, war dabei der, daß ich geneigt war, in der Aviditätssteigerung der Antikörper, die im Verlauf der Immunisierung eintritt, den Ausdruck eines Anpassungsvorganges die betreffenden, Antikörper liefernden Zellen an die einverleibten Antigene zu sehen, derart, daß diese Zellen sich immer spezifischer auf die Reaktion gegen diese Stoffe einstellen und daher auch immer avidere, das heißt stärker auf sie einwirkende Antikörper produzieren. Folgerichtig mußte ich dabei annehmen, daß dieser Anpassungsvorgang dann seine Höhe erreichen würde, wenn auch die entsprechende Zellfunktion, die zu dieser Anpassung die Veranlassung bietet, also die Antikörperproduktion, auf ihrem Maximum angelangt wäre. Ich dachte mir also diesen zu der Aviditätssteigerung führenden Anpassungsvorgang gewissermaßen als ein Resultat der Uebung der Zellen, auf einen bestimmten Reiz zu reagieren, und daß diese Uebung dann am größten sein mußte, wenn die Zelle in der intensivsten Tätigkeit begriffen war, mit der Abnahme derselben aber sofort geringer werden mußte, war nur eine einfache Konsequenz dieses Gedankenganges. So gelangte ich also zu der Anschauung, daß die Aviditäten der produzierten Antikörper in einer Relation stehen müßten mit der Intensität des Neubildungsvorganges, dem sie ihre Entstehung verdanken.

v. Eisler hat nun einige Versuche zur Nachprüfung meiner Befunde angestellt und hat dabei gefunden, daß man nicht selten Gelegenheit hat, „bei einem hochwertigen Serum die gleiche oder sogar eine geringere Avidität zu beobachten als bei einem minderwertigen“, daß somit „die Wertigkeit eines agglutinierenden Serums kein Maßstab für seine Avidität ist“.

Ich möchte hierzu sofort bemerken, daß es niemals meine Ansicht gewesen ist, in der Wertigkeit eines Serums einen Maßstab für seine Avidität gefunden zu haben, und daß sich auch in meinen Arbeiten kein dahin gehender Ausspruch findet. Jedem, der den Ablauf biologischer Reaktionen kennt, mußte

ja von vornherein die Tatsache geläufig sein, daß der tierische Organismus nicht mit der qualitativen und quantitativen Präzision chemischer Prozesse auf den immunisierenden Eingriff antwortet, sondern daß hierbei bedeutende individuelle Unterschiede bestehen können. Es war daher nur zu erwarten, daß verschiedene Tiere bei gleich hohem Serumtiter verschiedene Aviditätsverhältnisse darbieten würden, und daß umgekehrt bei gleicher Avidität verschieden hoher Serumtiter zur Beobachtung kommen könnte<sup>1)</sup>. Diese, wie mir scheint, vollkommen selbstverständliche Tatsache, die sowohl aus meinen eignen Befunden wie aus den Beobachtungen v. Eislers hervorgeht, macht es natürlich unmöglich, die Wertigkeit eines Serums als direkten Maßstab für die Avidität der in ihm enthaltenen Agglutinine zu benutzen.

Abgesehen von diesen rein individuell bedingten Unterschieden muß nun aber noch ein anderer Faktor von Einfluß auf die Aviditätsverhältnisse sein, und dieser Faktor ist in der Phase des Immunisierungsprozesses gelegen, in welcher sich das betreffende Versuchstier gerade befindet. Es ist ja leicht einzusehen, daß ein und derselbe Serumtiter in den verschiedensten Stadien der Antikörperproduktion auftreten kann, und sowohl in der Periode des Anstiegs oder des Absinkens des Titers wie in der Periode des Antikörpergleichgewichts zur Beobachtung kommen kann. — Vor allem wird es in dieser Beziehung nicht ohne Bedeutung für die Aviditätsverhältnisse sein können, wie lange Zeit seit der letzten immunisierenden Einspritzung vergangen ist. Denn da durch die Einführung von Antigen eine teilweise Bindung und Absorption von in den Säften zirkulierenden Antikörpern eintreten muß, wird sich unter diesen Umständen in vivo ein ähnliches Verhältnis herausstellen können, wie wir es in vitro beobachtet haben, daß nämlich nur die weniger aviden Agglutininfraktionen in den Gewebssäften und im Serum freibleiben, die hochaviden verschwunden

1) Von den Aviditätsdifferenzen, die durch das verschiedene Alter der Sera bedingt sein können und die auf die beim Lagern eintretende Aviditätsabschwächung zurückzuführen sind, soll hier gar nicht die Rede sein.



zu sein scheinen, die Gesamtavidität somit eine beträchtliche Herabsetzung erfahren hat. In einem solchen Falle wird man also unter Umständen eine geringere Avidität der Agglutinine finden, als bei einem anderen Versuchstiere, das zwar den gleichen Serumtiter aufweist, aber nicht mehr unter dem Einfluß der letzten Antigenzufuhr steht, also auch Antikörper hoher Avidität in seinem Serum besitzt.

Aber auch die Verhältnisse der Antikörperproduktion und -elimination werden notgedrungen in den verschiedenen Perioden der Immunisierung verschieden sein können. Es ist nämlich zu bedenken, daß der aktuelle Gehalt des Serums eines Tieres an Antikörpern zweifellos nicht nur von der Produktionsgeschwindigkeit von derselben abhängt, sondern auch von ihrer Zerstörungsgeschwindigkeit bzw. der Geschwindigkeit ihrer Elimination aus dem Organismus; ein und dieselbe Titerhöhe kann dann das einmal in der Weise zustandekommen, daß fortwährend große Mengen von Antikörpern gebildet, gleichzeitig aber auch große Quantitäten derselben entfernt werden, während das andermal, in einer anderen Periode die Immunisierung bez. bei einem anderen Tier, zwar wenig Antikörper produziert, dafür aber auch wenig zerstört werden<sup>1)</sup>. Besteht demgemäß wirklich — wie wir angenommen haben — eine Beziehung zwischen der Intensität der Antikörperproduktion und Avidität der gelieferten Immunprodukte, speziell der Agglutinine, so werden in diesen beiden supponierten Fällen bei gleichem Serumtiter große Differenzen in den Aviditäten zu erwarten sein.

---

1) Wie groß in Bezug auf die Zerstörungsgeschwindigkeit der Antikörper übrigens die individuellen Differenzen sind, das beweist eine vor Kurzem erschienene Arbeit von Levin (Communication de l'Institut de sérothérapie de l'état danois, T. 3, 1909), nach welchen bei anscheinend ganz gleichartigen Tieren von gleichem Gewicht nach Einführung gleicher Mengen von Antikörpern Unterschiede von über 50 Proz. in der Konzentration dieser Antikörper im Blute beobachtet wurden. Daß die Zerstörungsgeschwindigkeit sich übrigens auch bei demselben Tiere im Verlauf der Immunisierung ändern dürfte, ist eine naheliegende Vermutung, für die allerdings derzeit noch keine Beweise vorliegen.

Endlich wird auch — je nach der Phase der Immunisierung, der Einfluß der Abschwächungsvorgänge sehr verschieden ins Gewicht fallen, denen die Antikörper bei längerem Verweilen in der Blutbahn unterliegen. Wie wir nämlich in einer früheren Arbeit zeigen konnten, erfahren die Agglutinine nicht nur bei ihrer Aufbewahrung außerhalb des Organismus, sondern auch im tierischen Organismus selbst eine Abschwächung ihrer Avidität. Die in einem gegebenen Moment im Blut vorhandenen Antikörper stellen daher ein Gemisch von frischen, noch nicht veränderten, also noch hochaviden, und von bereits in ihrer Avidität geschädigten Immunprodukten dar. In den verschiedenen Immunisierungsperioden, d. h. bei verschiedener immunisatorischer Vorgeschichte, werden nun aber die Mischungsverhältnisse dieser jungen und älteren Antikörper sehr bedeutende Unterschiede aufweisen können, auch wenn, wie wir voraussetzen, der Serumtiter der gleiche ist. Da überdies nach den Arbeiten von Landsteiner und seinen Mitarbeitern auch die Labilität der Antikörper in den verschiedenen Phasen der Immunisierung nicht die gleiche ist, so ist also auch aus diesem Grunde zu erwarten, daß je nach dem Zustand des betreffenden Versuchstieres, je nach seiner Vorgeschichte, verschiedene Aviditäten zur Beobachtung kommen werden. Denn, das einmal, bei kräftiger Antikörperproduktion, werden in dem Serum die frischen, noch unveränderten Antikörper dominieren; bei einem anderen Tiere dagegen, das nur sehr wenig Antikörper erzeugt, aber sich auf das gleiche Niveau des Titers eingestellt hat, werden vornehmlich ältere, bereits abgeschwächte und wenig avide Agglutinine vorhanden sein.

Wie man sieht, gibt es also eine große Zahl von Möglichkeiten, welche bedingen können, daß zwei Tiere von gleichem Serumtiter sehr verschiedene Aviditätsverhältnisse aufweisen können<sup>1)</sup>. Ein Vergleich zwischen ver-

1) Schon in meiner ersten Aviditätsarbeit (Arch. f. Hyg., Bd. 64) habe ich (p. 107) geschrieben: „... daß zwei Sera oder Serumgemische bei gleichem Gehalt an Antikörpern und unter sonst gleichen Verhältnissen dennoch sehr verschiedene Eigenschaften besitzen können, je nach der Dauer der immunisatorischen Behandlung, durch welche sie erzeugt wurden.“

schiedenen Versuchstieren wäre somit überhaupt nur dann durchführbar, wenn sich dieselben im gleichen Stadium einer in gleicher Weise geleiteten Immunisierung befinden.

Ich kann daher einen von Kraus und Schwoner für das Diphtherieheilserum ausgesprochenen Satz ohne Weiteres für die agglutinierenden Sera akzeptieren: „Unabhängig vom Agglutiningehalt kann ein minderwertiges Serum schlechter oder besser wirken (i. e. höhere oder niedere Avidität aufweisen) als ein anderes, gleichwertiges. Ein hochwertiges Serum kann auch manchmal eine viel höhere Avidität haben, als andere gleichwertige, und umgekehrt kann es viel weniger wirksam sein.“

Wenn hiernach also die Beziehungen zwischen Wertigkeit und Avidität zweifellos keine derartig starren sind, daß zu einem bestimmten Serumtiter bei allen Versuchstieren und unter allen Umständen nur eine einzige, ganz bestimmte Avidität gehören würde, so ist damit andererseits doch ein Zusammenhang zwischen beiden Größen durchaus noch nicht ausgeschlossen. Vielmehr glaube ich durch meine Versuche wenigstens für die Agglutinine gezeigt zu haben, daß im Verlaufe einer systematischen Immunisierung im Allgemeinen die Avidität mit der Wertigkeit des Serums ansteigt. Hierfür sind gerade die von mir berechneten Durchschnittswerte der Absorptionsquotienten, die das Mittel einer großen Zahl von Versuchen darstellen, außerordentlich beweisend, und an dieser Beweiskraft vermag es natürlich auch nichts zu ändern, wenn gelegentlich einzelne Zahlen aus der Reihe fallen, was ja sowohl durch die bereits besprochenen individuellen und allgemeinen Verhältnisse als auch durch Versuchsfehler bedingt sein kann.

Würde man die Aviditätskurven der einzelnen Tiere — Avidität als Ordinate, Serumtiter als Abscisse gewählt — für eine bestimmte Phase der Immunisierung konstruieren — wozu allerdings die Zahl der Beobachtungen damals nicht ausreichte — so würden sich dieselben vermutlich durchaus nicht miteinander decken, sondern in verschiedenen Abständen von einander verlaufen, vielleicht auch verschiedene Steilheit auf-

weisen und sich sogar teilweise überkreuzen, sie würden aber alle das eine gemeinsam haben, daß mit wachsender Abscisse auch die Ordinate anwächst. Mehr habe ich mir aus meinen Versuchen nicht zu schließen erlaubt, und ich glaube, daß man diesen Schluß auf den allgemeinen Verlauf der Aviditätskurven auf Grund meiner Durchschnittszahlen, die mit steigendem Titer von 0,2 über 0,4 bis auf 0,79 anwachsen, wohl als berechtigt anerkennen muß. Das dem wirklich so ist, wird übrigens Dr. Busson in seiner nachstehenden Arbeit noch besonders nachzuweisen in der Lage sein.

Ich kann es daher nur für ein Mißverständnis ansehen, wenn von Eisler aus der Tatsache, daß der Serumtiter kein direktes und absolutes Maß für die Avidität abgibt und daß die Aviditätskurven verschiedener Tiere sich nicht miteinander decken, die Folgerung ableiten will, daß „die Avidität als eine mit der Wertigkeit nicht in direktem Zusammenhange stehende Eigenschaft des Serums“ angesehen werden kann.

Ich könnte diesen Ausspruch höchstens in dem Sinne gelten lassen, daß — wie ich dies in meinen früheren Arbeiten wahrscheinlich zu machen suchte — die Aviditäten direkt von der Intensität der Antikörperproduktion abhängig wären, somit mit der Wertigkeit des Serums, die ja ihrerseits durch die Intensität der Produktion mit bestimmt wird, nur indirekt zusammenhängen würden. In der Tat habe ich ja immer nur auf die Beziehung zwischen Avidität und Intensität der Immunkörperbildung hingewiesen, und habe die Wertigkeit der Sera nur insofern in die Betrachtung mit einbezogen als sie „einen gewissen Anhaltspunkt für die Beurteilung der Intensität der Antikörperproduktion liefert“<sup>1)</sup>. In diesem Sinne wäre zweifellos der gedachte Zusammenhang nur ein indirekter. Ich glaube jedoch nicht, daß von Eisler dies mit seinem oben erwähnten Ausspruche gemeint hat.

Das freilich muß zugegeben werden, daß im Einzelfall dieser Zusammenhang durch die oben

---

1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, p. 350.

erwähnten und besprochenen Umstände verdeckt werden kann.

Betrachten wir nun die von Eislerschen Zahlen etwas näher, so finden wir, daß die Wertigkeit der verwendeten Immunsera bei den Versuchen mit Pferdeserum zwischen 333 und 3333 A.E., bei den Versuchen mit Kaninchenserum zwischen 12 und 1000 A.E. schwankte. Noch geringer ist jedoch die Exkursionsweite der Titerzahlen, wenn man nur die zu ein und demselben Tiere gehörigen Werte miteinander vergleicht. Man findet dann, daß bei den Kaninchenversuchen der maximale Titer höchstens 20 mal größer war, wie der minimale: Bedenkt man nun, daß bei meinen eigenen Versuchen die Titerzahlen zwischen 100 und 100 000 A.E. und darüber schwankten, und daß trotz dieser bei weitem größeren Exkursionsweite nur eine Steigerung der Absorptionsquotienten von durchschnittlich 0,20 auf 0,79 beobachtet wurde, so ist einleuchtend, daß von vornherein bei den Eislerschen Versuchen keine sehr erheblichen Aviditätsunterschiede zu erwarten waren.

In folgender kleinen Tabelle finden sich nun die von Eislerschen Zahlen übersichtlich zusammengestellt.

Versuche von v. Eisler.

Datum	Kaninchen No.								Anmerk.
	1		2		3		4		
	Titer	Quo- tient	Titer	Quo- tient	Titer	Quo- tient	Titer	Quo- tient	
19. Mai	100	0,9	333	0,94	333	0,85	100	0,9	500 A.E. + 5 ccm Bakterien
27. „	100	0,92	—	—	1000	0,92	100	0,92	
28. Mai	100	0,75	—	—	1000	0,75	100	0,75	200 A.E. + 1 ccm Bakterien
7. Juni	200	0,85	—	—	1000	0,85	200	0,85	
16. Sept.	12	0,5	—	—	50	0,5	12	0,5	

Eine Betrachtung derselben ist nicht ohne Interesse. Die Versuche vom 19. und 27. Mai wurden, wie die Anmerkung entnehmen läßt, mit etwas anderer Versuchsanordnung an- gestellt, als die übrigen, später ausgeführten Experimente, so daß sie also für sich allein betrachtet werden müssen. Es ist nun leicht zu sehen, daß bei Kaninchen 1 und 4, deren

Serumtiter sich vom 19. zum 27. Mai nicht verändert hatte, auch die Absorptionsquotienten fast unverändert geblieben sind; denn deren Anstieg von 0,9 auf 0,92 wird man wohl kaum eine Bedeutung bemessen können, da er sich wohl innerhalb der Fehlergrenzen bewegt. Kaninchen 3 dagegen zeigt einen deutlichen Anstieg des Titers von 333 auf 1000; gleichzeitig ist aber auch der Absorptionsquotient von 0,85 auf 0,92 angewachsen.

Ein analoges Verhalten zeigen nun auch die meisten Zahlen der zweiten, späteren Versuchsserie. Sowohl bei Kaninchen 1 wie bei 4 steigt der Titer zuerst von 100 auf 200 an, um dann bis auf 12 abzusinken.

Dementsprechend steigen auch die Absorptionsquotienten von 0,75 auf 0,85 an und fallen dann auf 0,5 wieder ab, so daß also auch hier ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Bewegung der Titerzahlen und derjenigen der Absorptionsquotienten, und zwar genau in demselben Sinne besteht, wie ich ihn bei meinen eigenen Versuchen gefunden hatte. Nur bei Kaninchen 3 ist der Aviditätsanstieg von 0,75 auf 0,85 nicht von einer entsprechenden Steigerung des Titers begleitet; dem darauf folgenden Absinken des Titers von 1000 auf 50 entspricht aber auch hier wieder ein Rückgang des Absorptionsquotienten von 0,85 auf 0,5.

Es bestätigen somit auch die Versuche v. Eislers aufs deutlichste — wenn auch innerhalb eines engeren Rahmens — die Richtigkeit meiner Beobachtungen und lassen erkennen, daß in der Tat die Titerkurven und Aviditätskurven, natürlich nur in allgemeinen Zügen, die Tendenz haben, miteinander zu steigen und zu fallen.

Trotz dieser guten Uebereinstimmung der Eislerschen Befunde mit meinen eigenen habe ich doch Veranlassung genommen, die vorliegende Frage noch weiter zu verfolgen und noch mehr Material zu sammeln, um den von mir behaupteten Parallelismus der Aviditäts- und Titerkurven auch für das einzelne Tier — nicht nur, wie bisher geschehen, für die aus

einer Reihe von Tierexperimenten kombinierten Titerkurven — zu erweisen. Ich habe daher Dr. Busson gebeten, sich dieser Aufgabe unterziehen zu wollen und er wird in den folgenden Zeilen selbst über seine diesbezüglichen Experimente berichten.

Hier möchte ich nur noch bemerken, daß auch diese Versuche wieder eine vollständige Bestätigung meiner Ansicht gebracht haben. Ein Blick auf die von Busson gegebenen Kurvendiagramme lehrt in der Tat, wie befriedigend, ja in einzelnen Fällen sogar überraschend sich der Parallelismus des Kurvenverlaufs darstellt.

Wenn hiernach die Beziehung zwischen Avidität und Intensität der Antikörperproduktion wenigstens für die Agglutinine wahrscheinlich gemacht war, so war es doch nicht ohne weiteres selbstverständlich, daß diese Beziehung auch für die anderen Arten von Antikörpern, speziell für die Antitoxine, Geltung haben würde, und ich möchte daher diesbezüglich einige Bemerkungen hier anknüpfen.

Zweifellos haben alle Antikörper untereinander so viele gemeinsame Eigenschaften, daß die Annahme sehr naheliegt, daß auch ihre Entstehung von analogen Gesetzen beherrscht wird. Von diesem Standpunkte aus wäre also zu erwarten, daß eine so wichtige Beziehung, wie sie bei den Agglutininen zwischen der Intensität ihrer Produktion und den Aviditäten zu bestehen scheint, sich auch bei den anderen Immunkörpern wiederfinden müßte. Freilich wäre dabei zu erwägen, ob diese Beziehung nicht durch gewisse Umstände verdeckt sein könnte, bzw. nur unter bestimmten Bedingungen nachweisbar sein könnte.

Auf eine derartige Möglichkeit möchte ich nun hier das Augenmerk lenken, weil dieselbe vielleicht für die gleich zu besprechenden Beobachtungen, die man in dieser Richtung am Diphtherieantitoxin gemacht hat, von Bedeutung sein könnte.

Es ist selbstverständlich, daß die Aviditäten im Verlauf der Antikörperproduktion sich nur bis zu einer bestimmten, durch die Natur des betreffenden Organismus gegebenen Höhe erheben können, daß sie also nicht bei fortgesetzter Immuni-

sierung ins Unbegrenzte zunehmen werden, sondern sich einem bestimmten Grenzwert nähern müssen. Wie rasch dieser Grenzwert erreicht wird, darüber ist natürlich a priori nichts auszusagen, und es ist durchaus möglich, daß in dieser Richtung zwischen den verschiedenen Antikörpern große Differenzen bestehen.

Nehmen wir also den Fall an, daß bei einem Antitoxin das Maximum der Avidität schon sehr rasch erreicht wird, daß der von uns supponierte Anpassungsvorgang sehr früh sein Ende findet, so früh, daß die Intensität der Antitoxinproduktion noch lange nicht auf ihrem Maximum angelangt ist, dann wird von diesem Moment ab eine weitere Steigerung der Antikörperproduktion nicht mehr von einer Aviditätssteigerung gefolgt sein. Würde man dann verschiedene aus dieser Periode stammende Sera von verschiedener Wertigkeit miteinander vergleichen, so würden dieselben gleichwohl alle dieselbe (maximale) Avidität aufweisen müssen, und die Beziehung zwischen Avidität und Produktionsgeschwindigkeit der Antitoxine wäre dann nur in jener ersten Periode der Immunisierung festzustellen, in der die Avidität noch nicht ihr Maximum erreicht hat und der Serumtiter noch sehr niedrige Werte besitzt.

Wie bereits angedeutet, halte ich es nicht für ausgeschlossen, daß diese Verhältnisse bei dem Diphtherieheilserum eine Rolle spielen könnten. Berghaus<sup>1)</sup> hat nämlich bei einer Reihe von Untersuchungen, die er im Ehrlichschen Institute ausgeführt hatte, gefunden, „daß der Heilwert eines Serums einzig und allein von seinem Gehalt an Antitoxineinheiten abhängig ist, und daß es völlig irrelevant ist, ob diese Einheit von einem hoch- oder niederwertigen Serum genommen wird“, daß also mit anderen Worten Aviditätsunterschiede zwischen hoch- oder niederwertigen Seren nicht bestehen.

Nun sind die als „niederwertige“ im klinischen bzw. therapeutischen Sinn bezeichneten Sera immerhin doch bereits recht reich an Antitoxin. Soweit ich

1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 48 u. 49.



aus den Angaben von Berghaus entnehmen kann, war das schwächste der von ihm geprüften Sera noch immer ein 50-faches, und es wäre daher nicht unmöglich, daß bei noch weniger wirksamen, noch schwächeren Immunseren doch ein Unterschied gegenüber den hochwertigen in bezug auf die Aviditäten zutage treten könnte. Da solche ganz antitoxin-armen Sera natürlich zur therapeutischen Verwendung beim Menschen ungeeignet wären, so würde, auch wenn sich bei ihnen erhebliche niedrigere Aviditäten finden sollten, als bei den im Handel befindlichen „niedwertigen“ Seren, doch kein Anlaß vorliegen, diese Aviditätsverhältnisse bei der Serumprüfung zu berücksichtigen. Denn diese „niedwertigen“ Sera würden — wenn unsere Auffassung richtig ist — doch bereits aus einem Stadium der Immunisierung stammen, wo das mögliche Maximum der Aviditäten bereits erreicht ist, eine weitere Titersteigerung also nicht mehr von einer Aviditätserhöhung begleitet würde. — Es soll übrigens nicht verschwiegen werden, daß sowohl Berghaus, wie besonders Brüstlein<sup>1)</sup> eine Reihe von Beobachtungen gemacht haben, welche doch dafür zu sprechen scheinen, daß hochwertige Diphtherieheils sera eine höhere Avidität besitzen oder besitzen können, als niedrigwertige. Brüstlein wenigstens faßt seine Beobachtungen dahin zusammen, daß die Heilkraft des hochwertigen Serums nicht nur absolut, sondern auch relativ größer sei, als diejenige des niedrigwertigen Serums: denn vom hochwertigen Serum genügen, in Antitoxineinheiten berechnet, geringere absolute Mengen als vom niedrigwertigen zur Erzielung des gleichen Effekts. „Wenn“ — so führt Brüstlein weiter aus — „dieser größere Heilwert auf einer größeren Avidität der hochwertigen Sera beruhte, so würden die hochwertig antitoxisch nachgewiesenen Sera auch deshalb eine bessere Heilkraft besitzen, weil aller Erfahrung nach durch die längere Behandlung der Pferde, die notwendig ist, um ein hochwertig

---

1) Brüstlein, Arbeiten aus dem Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern, Heft 3, 1909. In einer eben erschienenen Arbeit (diese Zeitschr., Bd. 2, Heft 6) bestreiten übrigens Kraus und Schwoner die Zulässigkeit der Schlußfolgerungen Brüstleins.

antitoxisches Serum zu erzielen, auch Sera mit größerer Avidität erzielt würden.“ Damit wäre aber, wie man sieht, eine vollkommene Analogie mit meinen Befunden an den Agglutininen hergestellt, und der oben gemachte Erklärungsversuch für die Befunde von Berghaus würde sich von selbst als überflüssig erweisen.

Es ist nicht unmöglich, daß diese von Brüstlein beobachteten Aviditätsunterschiede zwischen hoch- und niedrigwertigen Diphtherieheilsereen deutlich und konstant zutage treten würden, wenn zu den Versuchen stets frische, nicht abgelagerte Sera verwendet würden, da es denkbar ist, daß die beim Lagern eintretende Abschwächung der Wertigkeit und der Aviditäten geeignet wäre, diese Unterschiede zu verringern bzw. vollkommen zu verdecken.

Nur noch einige Worte über das diesbezügliche Verhalten des Dysenterieserums. Nach Doerr soll hier die Menge des Antitoxins in keiner Beziehung zu seiner Avidität stehen, und der genannte Forscher verweist, um dies zu erhärten, auf seine mit Kraus angestellten Beobachtungen, nach denen im Verlauf der Immunisierung die Avidität bei gleich bleibendem Antitoxingehalt des Serums erheblich zugenommen habe. Ob hier ein wesentlicher Unterschied des Dysenterieantitoxins gegenüber den Agglutininen und eventuell auch dem Diphtherieantitoxin vorliegt, oder ob es sich nur um eine der verschiedenen früher aufgeführten Möglichkeiten handelt, wie die Beziehungen zwischen Wertigkeit und Avidität verdeckt werden und unkenntlich gemacht werden, ist natürlich schwer zu unterscheiden. Nur auf den einen Punkt mag hier verwiesen werden, daß bei den von Doerr als besonders instruktiv aufgeführten Beispielen bei einzelnen Heilversuchen ein verschieden langer Zeitraum (bis zu einem Monat) zwischen der Blutentnahme und der Anstellung des Experimentes verstrichen war, was bei der von diesem Forscher betonten ziemlich großen Labilität des Antitoxins vielleicht nicht als gleichgültig angesehen werden darf. Wenigstens habe ich bei meinen Agglutinin- und Hämolyisinversuchen gelegentlich schon nach wenigen Tagen eine starke Abnahme des Titors und der Aviditäten beobachtet. Kraus und Schwoner be-

tonen übrigens (*loco citato*) ebenfalls den größeren Heilwert frischer Sera, gegenüber dem älterer. Es wird also vielleicht neuer besonders zu diesem Zwecke angestellter Versuchsreihen mit genau austitrierten frischen Immunseren bedürfen, um in der vorliegenden Frage zur völligen Klarheit zu gelangen.

Vielleicht verhält es sich bei dem Dysenterieheilserum so, daß die Aviditätskurve viel steiler verläuft als die Titerkurve, daß aber trotzdem die von uns für die Agglutinine festgestellten Beziehungen zwischen beiden auch hier ihre Geltung besitzen.

Nicht uninteressant sind — um nach dieser Abschweifung wieder zu den vorliegenden Arbeiten zurückzukehren — einige Versuche Bussons, bei welcher nicht, wie bei den Hauptversuchen, die Immunisierung in der üblichen Weise — also durch Bakterieninjektionen in größeren, 8—10 Tage betragenden Zeitintervallen — geleitet wurde, sondern bei welchen eine Zeitlang täglich kleine Bakterienmengen eingespritzt wurden. Dabei zeigte sich — wie ja zu erwarten war — daß der Parallelismus der Titer- und Aviditätskurven in dieser Phase der Immunisierung infolge der fortwährenden Resorption der Antigene und der damit verbundenen Absorption der avidesten Agglutininfraktionen aus dem Serum sehr wesentlich gestört war und erst wieder deutlich zutage trat, wenn mit der Bakterieneinspritzung ausgesetzt wurde, die Antikörperproduktion also ungestört vor sich gehen konnte.

Es ist diese Beobachtung von Wichtigkeit für eine Reihe weiterer Versuche, die Dr. Rintelen, Assistent an der medizinischen Klinik, auf mein Ersuchen angestellt hat. Rintelen benutzte das Auftreten einer kleinen Hausepidemie von Typhus, um bei den Patienten die Aviditätsverhältnisse im Verlauf der Erkrankung und Rekonvaleszenz näher zu verfolgen. Wenn das derzeit zur Verfügung stehende Material auch nur ein recht spärliches ist, so läßt sich doch in einzelnen Fällen ein Zusammenhang zwischen einem eintretenden Rezidive, also einem neuerlichen Einbruch von Typhusantigenen in die Blutbahn, und einer Absenkung der Aviditätskurve wahrscheinlich machen, wie denn auch mit aller Reserve einige andere Folgerungen aus diesen Versuchen gezogen werden

könnten, bezüglich derer auf die Arbeit von Rintelen verwiesen sei.

Den Schluß dieser Serie von Aviditätsstudien endlich bilden vergleichende Absorptionsversuche, die ich an schwer agglutinablen, längere Zeit auf Immunserum fortgezüchteten und an gewöhnlichen, leicht agglutinablen Typhusbacillen angestellt habe, und die in gewissen Sinne eine Fortführung meiner im Jahre 1903 publizierten Arbeit „Ueber die Immunisierung des Typhusbacillus gegen spezifische Agglutinine“<sup>1)</sup> bedeuten.

## II. Ueber den Zusammenhang von Agglutinationstiter und Avidität bei Immunisierung mit Typhusbacillen.

Von Dr. phil. et med. **Bruno Busson**,  
II. Assistenten am Hygienischen Institut in Graz.

Mit 6 Kurven im Text.

Trotz der Aktualität der Aviditätsfragen liegen meines Wissens keine systematischen Untersuchungen darüber vor, wie sich beim einzelnen Tier in den verschiedenen Phasen des Immunisierungsprozesses mit Typhusantigen Agglutinationstiter und Avidität der gebildeten Antikörper zueinander verhalten. Es war daher gewiß von Interesse, Studien nach dieser Richtung zu machen.

Da sich meine Versuche unmittelbar an jene P. Th. Müllers<sup>2)</sup> anreihen und eine Ergänzung derselben bilden sollen, kann füglich von der Besprechung des Gegenstandes an und für sich abgesehen werden. In jüngster Zeit hat sich eben Müller eingehend mit dieser Frage beschäftigt und aus den Ergebnissen seiner Versuche wesentliche Schlüsse gezogen.

Er sagt p. 111: „Im Verlaufe der Immunisierung findet eine allmähliche Aviditätssteigerung der produzierten Antikörper statt, welche sich je nach der Natur derselben, beziehungsweise nach der Art der Prüfung entweder in einer

1) Münchn. med. Wochenschr., 1903.

2) Archiv f. Hyg., Bd. 64.

Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit dem betreffenden Antigen äußert, oder aber in einer vermehrten Bindungs- oder Absorptionskraft für das letztere, wobei demgemäß die Werte des Absorptionsquotienten sich immer mehr der Einheit nähern.“

Müller beobachtete ferner eine Korrelation zwischen der Avidität der produzierten Antikörper einerseits und der Intensität des Neubildungsvorganges derselben andererseits.

Da er also m. a. W. fand, daß in verschiedenen Immunisierungsperioden Antikörper verschiedener Avidität produziert werden, so zieht er als wichtige praktische Konsequenzen seiner Beobachtungen nachstehende Schlüsse:

„4) Als praktische Konsequenz dieser Tatsachen ergibt sich die Forderung, Heilsera nur in möglichst frischem Zustande zu verwenden, da die Avidität des Antikörpers für den therapeutischen Effekt nicht gleichgültig sein kann.

5) Da außerdem auch die Phase der Immunisierung, in welcher das Immunserum gewonnen wird, von größtem Einfluß auf die Avidität der Antikörper ist, so wird auch darauf geachtet werden müssen, daß die Serumentnahme zu einem möglichst günstigen Zeitpunkte stattfindet. (Natürlich müssen die besonderen optimalen Bedingungen für die verschiedenen Arten von Antikörpern durch eigene Versuche festgestellt werden, da ja ein Schluß von den Agglutininen auf die Antitoxine, Bakteriolyse etc. nicht ohne weiteres zulässig erscheint.)

6) Diese Forderung wäre in praxi dann nicht schwer zu erfüllen, wenn zu der Zeit des maximalen Serumtiters auch die Aviditäten ihren höchsten Wert erreichen, wie bei den Agglutininen.“

Ich habe nun, einer Anregung des Herrn Prof. P. Th. Müller folgend, systematische Untersuchungen über das Verhalten der Avidität zur Antikörperproduktion im Verlaufe des Immunisierungsprozesses angestellt und möchte, bevor ich in den Gegenstand eingehe, nur noch einiges über die hierbei angewandte Technik und Versuchsanordnung vorausschicken.

Als für den Zweck meiner Untersuchungen am geeignetsten habe ich die Verhältnisse an Typhusagglutininen studiert;

hierfür stellte ich mir zunächst eine dichte Bacillenaufschwemmung einer 24-stündigen Agartypuskultur in einer für alle Versuche ausreichenden Menge her, die zu  $\frac{1}{2}$  Proz. mit Karbolsäure versetzt wurde. Zur Bestimmung des Agglutinationstiters wurde zu jeder Probe je  $\frac{1}{10}$  ccm dieser Aufschwemmung zugefügt, und ebenso bei den Absorptionsversuchen 0,1 des Gesamtvolumens, welches dann in beiden Fällen stets 1,1 ccm betrug.

Die Verdünnungen des Immunserums selbst wurden, wie bei den Versuchen Müllers, einheitlich mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen.

Zunächst wurde jedesmal, nach Art der Widalschen Reaktion, annähernd die Titerhöhe festgestellt und die hierbei gefundene Zahl als Ausgangsverdünnung für die feinere Auswertung des Agglutinationstiters benutzt, in der Art, daß ich zwölf Verdünnungen nach folgendem Schema ansetzte:

Serum (entsprechend verdünnt) in ccm	Physiologische NaCl-Lösung in ccm	Bacillenaufschwemmung
1,0	—	0,1
0,9	0,1	0,1
0,8	0,2	0,1
0,7	0,3	0,1
0,6	0,4	0,1
0,5	0,5	0,1
0,4	0,6	0,1
0,3	0,7	0,1
0,25	0,75	0,1
0,2	0,8	0,1
0,15	0,85	0,1
0,1	0,9	0,1

Alle Proben wurden also auf dasselbe Volum gebracht und ihnen, wie erwähnt, eine stets gleiche Bacillenmenge zugesetzt.

Da Müller bei seinen „Verdünnungsversuchen“ nachweisen konnte, daß im Sinne Eisenbergs und Volks mit abnehmender Menge der zur Absorption dargebotenen Agglutinineinheiten ein Anwachsen des Absorptionsquotienten stattfindet, so wurde bei den vorliegenden Absorptionsversuchen danach gestrebt, möglichst immer mit der gleichen Menge von

Agglutinineinheiten zu arbeiten, was ich dadurch erreichte, daß die jeweiligen Sera vor der Absorption durch entsprechende Verdünnung auf möglichst gleichen Titer gestellt wurden. Derselbe betrug, wie aus den Tabellen ersichtlich ist, um 500 A.E.

Zur Absorption selbst wurden die einzelnen Proben je eine halbe Stunde bei 37° gehalten und dann, nachdem die Bakterien scharf abzentrifugiert worden waren, die entsprechenden weiteren Verdünnungen in der geschilderten Weise angesetzt. Alle Proben wurden, nach 4-stündigem Verweilen im Brutschranke, bei Zimmertemperatur bis zum nächsten Tage stehen gelassen und dann erst abgelesen.

Bei der vergleichenden Zusammenstellung der Verhältnisse von Agglutinationstiter und Avidität ist der Versuch gemacht worden, dieselben der Anschaulichkeit halber in Form von Kurven graphisch darzustellen, wobei die Zahl der Injektionen die Abscisse, die Wertigkeiten und Absorptionsquotienten die Ordinaten bilden, was mir anschaulicher zu sein scheint, als Zahlentabellen für sich allein.

Zu meinen Versuchen verwendete ich 3 Kaninchenpaare, von denen das letzte für den am Ende zu besprechenden forcierten Immunisierungsversuch verwendet wurde. Die Versuchstiere mögen in der Folge mit  $M_I$ ,  $M_{II}$ ,  $M_{III}$ ,  $M_{IV}$ ,  $W_I$ ,  $W_{II}$  bezeichnet werden ( $M$  = Männchen,  $W$  = Weibchen).

Den ersten vier Versuchstieren wurde jedesmal vor neuerlicher Injektion aus der Ohrvene Blut entnommen, wobei die Zeitintervalle relativ groß gewählt wurden, um sicher zu sein, daß die Resorption der eingespritzten Antigene auch wirklich beendet war. Aus den Tabellen ersieht man, daß diese Zeitintervalle in der ersten Zeit um einiges untereinander schwanken, was darin begründet war, daß ich eben das Optimum für die Blutentnahme zu ermitteln suchte. Im allgemeinen dürfte es, wie sich herausstellte, nach 8—10 Tagen eingetreten sein, weshalb denn auch ungefähr dieses Zeitintervall bei den weiteren Versuchen eingehalten wurde.

Nach diesen einleitenden Worten mögen zunächst die zusammengefaßten Versuchsprotokolle folgen.

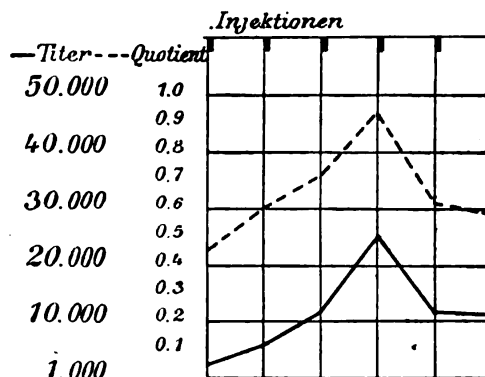
## I. Versuch MII.

Zahlentabelle I.

Tag der Injektion	Tag der Blut-entnahme	Zeitintervall zwischen beiden	Wertigkeit des Vollserums resp. Agglutinationstiter	Agglutinin-einheiten, dargeboten zur Absorption	Quotient
30. III.	17. IV.	18	2 500	500	0,45
21. V.	2. V.	11	6 666	555	0,60
	7. V.	16	4 444	370	0,60
9. V.	19. V.	10	12 500	500	0,72
21. V.	29. V.	8	25 000	625	0,94
29. V.	7. VI.	9	12 000	500	0,63

Betrachten wir zunächst den Versuch I mit den zugehörigen Tabellen. Aus der Zahlentabelle läßt sich zunächst ohne weiteres erkennen, wie das Ansteigen des Agglutinationstiters von einem deutlichen Anwachsen des Aviditätswertes begleitet wird, dessen Ausdruck ja der Absorptionsquotient bildet. Im Verlaufe des Immunisierungsprozesses steigt letzterer schon nach der 4. Injektion auf 0,94 an, nähert sich also schon fast der Einheit und folgt dabei einer Zunahme des Agglutinationstiters von 2500 auf 25 000.

Noch übersichtlicher als durch die Zahlentabelle wird dieses Anwachsen des Quotienten bei gleichzeitiger Steigerung der Antikörperproduktion, d. h. also mit dem Anstieg des Agglutinationstiters, durch die beigefügte Kurve 1 illustriert. Man sieht daraus ein fast völliges Parallellaufen der Linien für

Kurve 1<sup>1)</sup>. Versuch I, Tier MII.

1) Bei obiger Kurventafel wurde ebenso wie bei den folgenden die Zahl der Injektionen als Abscissen-, die Wertigkeit als Ordinatenachse angenommen. Die ausgezogene Linie zeigt die jeweilige Titerhöhe, die punktierte die Größe des Quotienten an.



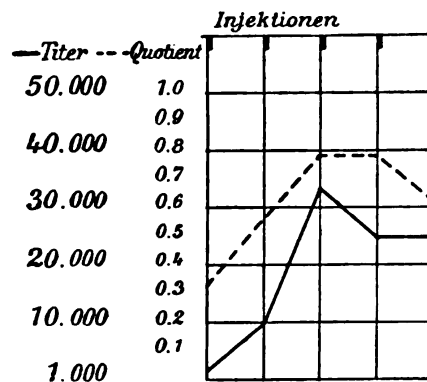
beide Werte auch in ihrem Absinken. Auf die einzelnen Verhältnisse werde ich später noch zusammenfassend zurückkommen.

## II. Versuch WII.

Zahlentabelle II.

Tag der Injektion	Tag der Blutentnahme	Zeitintervall zwischen beiden	Wertigkeit des Vollserums resp. Agglutinationstiter	Agglutinin-einheiten, dargeboten zur Absorption	Quotient
30. III.	17. IV.	18	3 333	333	0,33
21. IV.	2. V.	11	6 666	444	0,50
	7. V.	16	10 000	833	0,56
9. V.	19. V.	10	33 333	505	0,78
21. V.	29. V.	8	25 000	500	0,78 <sup>1)</sup>
29. V.	7. VI.	9	25 000	500	0,63

Auch hier sehen wir, wie das Anwachsen des Quotienten Hand in Hand geht mit dem Anstiege des Titors bis zur 4. Injektion, von welchem Punkte ab wir zunächst ein Ab-



Kurve 2. Versuch II, Tier WII.

vor uns haben, dessen Ergebnisse wir nicht mit demselben Maßstabe messen dürften, den wir beim Ablauf chemischer Reaktionen anzuwenden gewohnt sind. Immerhin ist auch trotz dieser kleinen Inkongruenz der Parallelismus ein sehr befriedigender.

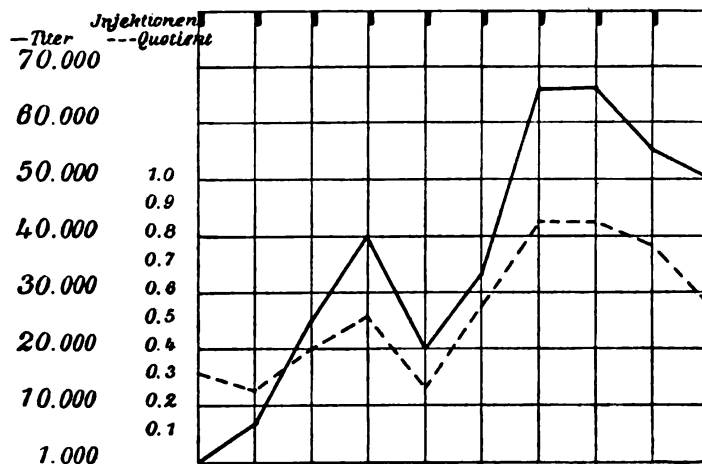
1) Siehe Kurve 2.

III. Versuch W<sub>I</sub>.

Zahlentabelle III.

Tag der Injektion	Tag der Blutentnahme	Zeitintervall zwischen beiden	Wertigkeit des Vollserums resp. Agglutinationstiter	Agglutinin-einheiten, dargeboten zur Absorption	Quotient
10. III.	15. III.	5	800	500	0,31
17. III.	22. III.	5	5 000	500	0,20
	27. III.	10	7 407	370	0,25
29. III.	7. IV.	9	25 000	500	0,40
9. IV.	22. IV.	13	40 000	571	0,51
24. IV.	4. V.	10	20 000	500	0,27 <sup>1)</sup>
5. V.	15. V.	10	33 333	416	0,56
17. V.	25. V.	8	66 666	500	0,85
26. V.	3. VI.	8	66 666	501	0,84
3. VI.	11. VI.	8	55 000	500	0,77

Bei der Betrachtung der Tabelle III fällt uns sofort das plötzliche Absinken des Titors und der Avidität bis auf die halben Werte nach der 5. Injektion ins Auge. Diesem Absturz ist eine subkutane Injektion vorausgegangen. Die nächste

Kurve 3. Versuch III, Tier W<sub>I</sub>.

Injektion hat wieder einen erheblichen Anstieg der Zahlenwerte zur Folge, und der Parallelismus kommt gerade bei diesem Versuch und insbesondere in der Kurve 3 überraschend schön zum Ausdruck. Nach der 8. Injektion scheint der

1) Der Abfall von Titer und Avidität folgen hier auf eine subkutane Injektion.

Höhepunkt der Antikörperproduktion erreicht. Es folgt auf eine kurze stationäre Phase, die sich in den horizontalen Linien ausdrückt, ein allmähliches Absinken der Werte.

IV. Versuch M<sub>I</sub>.

Zahlentabelle IV.

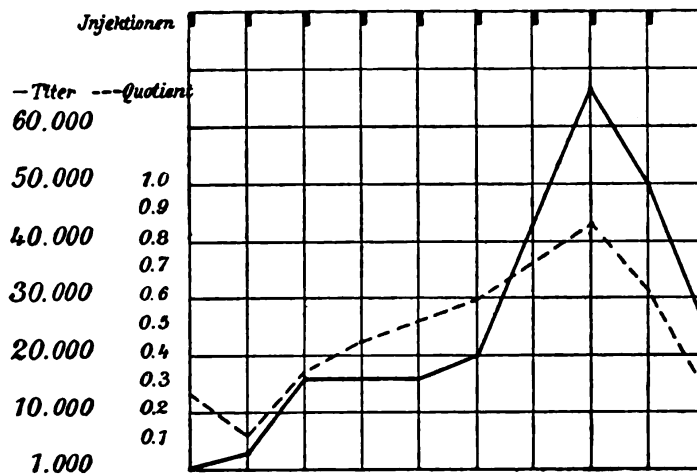
Tag der Injektion	Tag der Blut-entnahme	Zeitintervall zwischen beiden	Wertigkeit des Vollserums resp. Agglutinationstiter	Agglutinin-einheiten, dargeboten zur Absorption	Quotient
6. III.	11. III.	5	500	333	0,27
13. III.	18. III.	5	3 333	833	0,12 <sup>1)</sup>
20. III.	30. III.	10	16 666	555	0,34
31. III.	9. IV.	9	16 666	333	0,45
10. IV.	23. IV.	13	16 666	446	0,52
26. IV.	6. V.	10	20 000	666	0,59
9. V.	19. V.	10	33 333	505	0,45
21. V.	29. V.	8	66 666	500	0,86
29. V.	7. VI.	9	50 000	500	0,63

Auch dieser vierte Versuch zeigt uns dieselben Verhältnisse, wie die ihm vorangehenden, nur erfolgt hier das Anwachsen der Werte bis zur 7. Injektion mehr allmählich, erreicht aber dann mit einem plötzlichen Anstieg den Höhepunkt.

1) Diese Abnahme der Avidität kann zum Teil dadurch bedingt sein, daß hier schon nach 5 Tagen Blut entnommen wurde, was, wie sich später herausstellte, unbedingt ein zu kurzer Zeitraum ist. Auch ist die zur Absorption dargebotene Agglutininmenge eine verhältnismäßig hohe, was, wie Müller in seinen Verdünnungsversuchen gezeigt hat, die Größe des Absorptionsquotienten sehr beeinflußt. Um ein Beispiel zu geben, bringe ich folgende Zahlen, die deutlich zeigen, wie groß in dieser Richtung die Beeinflussung sein kann. Wurden 256 Einheiten zur Absorption dargeboten, so erhielt er den Quotienten 0,71, der aber bis auf 0,57 fiel, wenn mit 512 Einheiten absorbiert wurde, und ebenso fiel der Quotient von 0,82 auf 0,56 wenn die zur Absorption dargebotene Agglutininmenge von 1066 auf 2133 stieg.

Wären also im vorliegenden Falle, wie bei den übrigen Versuchen, geringere Agglutininmengen zur Absorption verwendet worden, so würde ein höherer Quotient erhalten worden sein, und der Parallelismus der Kurven würde weniger gestört erscheinen. Diese Auseinandersetzung illustriert aufs deutlichste, wie leicht durch unzweckmäßige Versuchsanordnung das Bestehen einer Gesetzmäßigkeit verdeckt werden kann.

Zum richtigen Verständnis beider Tabellen ist hier eine Differenz zwischen der Zahlentabelle und der Kurventafel aufzuklären. Die Abweichung besteht darin, daß in der Zahlentabelle nach der 7. Injektion ein Absinken des Quotienten bei ansteigendem Titer zu beobachten ist, das in der Kurventafel eine Korrektur erfahren hat. Hierzu sei folgendes bemerkt: Der Absorptionsversuch konnte äußerer Umstände halber erst 2 Tage nach der Blutentnahme, und nachdem bereits der Titer festgestellt war, vorgenommen werden. Am 3. Tage wurde derselbe neuerdings wiederholt, wobei sich ergab, daß die Avidität fast auf Null abgesunken war, so daß also dieser verspätet angestellte Versuch nicht als einwandfrei angesehen

Kurve 4. Versuch IV, Tier M<sub>I</sub>.

werden konnte und deshalb bei Konstruktion der Kurve übergangen wurde.

Was diese enorm rasche Abnahme der Avidität verursachte, kann ich natürlich nicht sagen; ich habe eine solche Labilität in der Folge weder am selben noch an anderen Tieren in nur annähernd gleichem Ausmaße beobachtet. Leider konnte, da mittlerweile schon injiziert worden war, eine neue Blutprobe nicht mehr entnommen werden. In der Kurventafel wurde, wie gesagt, dieser Versuch übergangen und die beiden benachbarten Werte durch eine gerade Linie verbunden, was wohl annähernd den wahren Verhältnissen entsprechen dürfte.

Was lehren nun die vorstehenden Versuche? Zunächst läßt ein Blick auf die Kurventafeln deutlich erkennen, daß tatsächlich im Sinne Müllers ein Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Titer, d. h. der Antikörpermenge und der Avidität besteht, ja sogar in einem so weitgehenden Maße, daß selbst den Schwankungen, die der Agglutinationstiter im Laufe der Immunisierung durchmacht, die Avidität im selben Sinne folgt, wie besonders die Versuche I und III deutlich zeigen. Das Ansteigen des Titers begleitet eine Zunahme, das Abfallen ein Absinken der Absorptionsquotienten. Dies ist wohl der Allgemeineindruck der Kurven und Zahlentabellen.

Der gleichmäßige Anstieg beider Werte, wie er sich bei unseren Versuchsergebnissen darstellt, bestätigt die Ansicht Müllers, daß im Laufe der Immunisierungsvorgänge mit zunehmender Produktion resp. Intensität des Neubildungsprozesses von Antikörpern auch die Avidität steigt. Im Laufe der Immunisierung sind ferner Titterschwankungen zu beobachten, die der Ausdruck einer wechselnden Zu- und Abnahme der jeweils im Blute vorfindlichen Antikörper sind, und bei unserem Versuche von gleichsinnigen Schwankungen der Avidität begleitet sind.

Da man das Absinken des Titers wohl meist mit einer verminderten Antikörperproduktion in Beziehung bringen darf, so besteht also auch hier der von Müller angenommene Parallelismus zwischen der Intensität der Neubildung der Agglutinine und deren Avidität. — Bei näherer Betrachtung der Kurven drängt sich uns aber die Frage auf, welche Ursachen wohl für das plötzliche auffällige Absinken beider Werte, das im Versuch III während der Phase des Ansteigens des Titers beobachtet wurde, verantwortlich gemacht werden können.

Ich bin dabei zu folgender Ueberlegung gekommen.

Das Absinken der Titerkurve und der Aviditätskurve fand im Anschluß an eine subkutane Injektion der Typhusbacillen statt, an die sich, wie wir aus den bekannten Arbeiten von Dönitz<sup>1)</sup> und aus den jüngsten Untersuchungen von

---

1) Archiv internat. de Pharmacodynamie, T. 5, 1899.

Berghaus<sup>1)</sup> wissen, eine bedeutend langsamere Resorption der eingebrachten Stoffe anschließt, als dies bei der sonst bei unseren Experimenten eingehaltenen intraperitonealen Einverleibung der Fall zu sein pflegt. Es liegt also nichts im Wege, anzunehmen, daß hier nur eine außerordentlich zögernde Resorption der Typhusantigene stattgefunden hat, derart, daß durch eine ganze Reihe von Tagen stets nur geringe Mengen derselben in den Kreislauf übergingen. Da diese geringen Antigenmengen sofort durch die in den Säften zirkulierenden Antikörper (Agglutinine) abgesättigt werden mußten, so konnten sie keinen genügenden antigenetischen Reiz auf die Bildungsstätten der Antikörper ausüben, und es mußte zu einem gewissen Stillstand bzw. zu einer Verlangsamung der Antikörperproduktion kommen. Andererseits mußte aber der fortwährende Uebertritt geringer Antigenmengen ins Blut im Sinne einer Absorption wirken, indem gerade die avidesten Agglutinine abgefangen und gebunden werden mußten. Es ist klar, daß beide Vorgänge vereint dahin wirken mußten, Titer und Avidität herabzusetzen.

Schließlich wäre es vielleicht auch denkbar, daß bei dieser subkutan erfolgten Injektion andere Gewebe zur Produktion der Antikörper mitherangezogen würden, als bei unseren Versuchen bisher in Tätigkeit getreten waren. Diese Gewebe könnten dann natürlich, als zum ersten Male Antikörper liefernd, auch nur wenig avide Agglutinine produzieren, was gleichfalls geeignet wäre, die Aviditätskurve herabzudrücken.

Es ist selbstverständlich, daß diese Erklärungen mit aller Reserve aufgenommen werden sollen.

Betrachtet man die Kurven genauer, so fällt es auf, wie sehr verschieden sich bei den einzelnen Tieren das Verhältnis der Titerhöhe zur Avidität verhält. Bei einer Gegenüberstellung der vier Versuche zeigt sich, daß diejenigen Tiere, welche gleich anfangs avide Antikörper produzieren, weit niedrigere Titerwerte erreichen als die anderen. Mit anderen Worten: einer bestimmten Titerhöhe entspricht keinesfalls jedesmal dieselbe Avidität, im Gegenteil, es ergeben sich hier bei den einzelnen Tieren merkliche Unterschiede, und die

---

1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 48, Heft 1 u. 2.

gefundene Abhängigkeit der Größe des Absorptionsquotienten von der Höhe des Agglutinationstiters hat ihre Gültigkeit nur für den Verlauf der Immunisierung bei ein und demselben Tiere. — Trotz diesen individuellen Verschiedenheiten ist aber, wie wir gesehen haben, die Tatsache dieses Zusammenhanges eine allgemeine.

Folgende Vergleichstabelle I zeigt die annähernd gleichen Aviditäten entsprechenden Titerhöhen bei den verschiedenen Tieren, wobei die Ergebnisse der später zu besprechenden forcierten Immunisierungsversuche naturgemäß nicht berücksichtigt werden, weil hier andere Verhältnisse vorliegen.

Vergleichstabelle I<sup>1)</sup>.

Aviditätswerte = Quotienten	0,1—0,2	0,2—0,3	0,3—0,4	0,4—0,5
zugehörige Titerhöhen	3333 IV	500 IV 7 407 III 20 000 III	3 333 II 16 666 IV 800 III 25 000 III	2 500 I 16 666 IV

Aviditätswerte = Quotienten	0,5—0,6	0,6—0,7	0,7—0,8	0,8—0,9	0,9—1,0
zugehörige Titerhöhen	6 666 I 10 000 II 16 666 IV 20 000 IV 40 000 IV 33 000 III	12 000 I 25 000 II 50 000 IV	12 000 I 33 333 II 25 000 II 55 000 III	666 666 IV 666 666 III 666 666 III	25 000 I

Aus der Vergleichstabelle ersehen wir ohne weiteres, wie sehr verschieden das Verhältnis beider Werte sich bei den einzelnen Tieren darstellt, so daß beispielsweise beim Versuchstiere M<sub>II</sub> einer Titerhöhe von nur 25 000 schon ein Absorptionsquotient von 0,94 zugehört, während beim Versuch III derselben Titerhöhe ein Quotient von nur 0,40 entspricht.

Diese individuellen Unterschiede von Titerhöhe und Avidität sind auch in der Uebersichtstabelle Müllers<sup>2)</sup> zum

1) Die römischen Zahlen bedeuten die Nummern des Versuches.

2) Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, 1908.

Ausdruck gekommen und haben weiter für Eisler den Anlaß geboten, gegen die daraus gezogenen Schlußfolgerungen Müllers Stellung zu nehmen und die Berechtigung zu bezweifeln, aus den individuell verschiedenen Einzelwerten Mittelzahlen von allgemeinerer Gültigkeit zu berechnen.

Es war daher naheliegend, auch aus den durch unsere vier Versuche erhaltenen Werten die Mittelzahlen zu berechnen und einander gegenüberzustellen, da zu erwarten stand, daß hierbei die individuellen Verschiedenheiten bei jeder einzelnen Summierung in gleicher Weise ins Gewicht fallen würden, und daß demnach die sich ergebenden Mittelwerte die gleiche Gesetzmäßigkeit aufweisen würden, wie sie schon beim einzelnen Tier sich ergeben hatten. Ich lasse einem Auszuge der Tabelle Müllers meine eigenen Zahlen ohne jede Korrektur (Uebersichtstabelle III) folgen.

Tabelle von Müller.

Titerhöhe	100—1000	1000—10 000	10 000—100 000 und darüber
Quotient	0,20	0,41	0,79

Uebersichtstabelle III (eigene Versuche).

Titerhöhe	500—5000	5000—10 000	10 000 bis 20 000	20 000 bis 40 000	40 000 bis 70 000
zugehöriger Quotient	0,45	0,60	0,72	0,94	0,86
	0,33		0,63	0,78	0,63
	0,27		0,34	0,63	0,85
	0,31		0,45	0,45	0,84
	0,12		0,52	0,40	0,77
			0,59	0,56	
			0,27	0,51	
Mittel	0,23	0,47	0,50	0,61	0,79

Wie man ohne weiteres erkennt, wird man auch durch die Ergebnisse dieser Mittelzahlen trotz der großen individuellen Verschiedenheiten zu denselben Schlußfolgerungen berechtigt, wie P. Th. Müller, daß nämlich im allgemeinen dem höheren Agglutiningehalte der Sera auch



ein höherer Absorptionsquotient entspricht, daß also die Aviditäten mit der Wertigkeit der Sera ansteigen.

Im speziellen Falle allerdings muß nach den vorliegenden Untersuchungen die Bedeutung der individuellen Verhältnisse eigens betont werden, wie dies aber auch Müller bereits in seiner ersten Aviditätsarbeit betont hatte<sup>1)</sup>, und auch in der Einleitung zu dieser Serie von Arbeiten neuerdings hervorhebt.

Eine auffallende Tatsache ergibt sich ferner aus der vergleichenden Gegenüberstellung unserer vier Kurventafeln. Bei den Versuchen I und II sehen wir die Aviditätskurven oberhalb der Titerkurven verlaufen, ein Verhalten, das sich in den Versuchen III und IV umkehrt.

Dort also, wo die Avidität gleich zu Anfang und bei relativ niedrigem Titer höhere Werte erlangte, bleibt dieses Verhältnis während der ganzen Dauer des Versuches bestehen, und es zeigt demgemäß auch der Gipfel der Titerkurve eine relativ geringe Höhe. Umgekehrt zeigt sich in den Versuchen III und IV die Aviditätskurve, die zu derselben Gipfelhöhe führt wie bei den früher genannten Experimenten, von einer hochansteigenden Titerkurve begleitet. Gleichzeitig ist zu bemerken, daß hier der Gipfel der Kurven viel später (erst nach der 8. Injektion) erreicht wird, während das Maximum bei Versuch I und II schon nach der 4. Injektion eintritt.

Es liegt nahe, nach einer Erklärung für dieses merkwürdige, verschiedene Verhalten beider Gruppen von Tieren zu suchen, welche alle die erwähnten Tatsachen zusammenfaßt.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre nun vielleicht die folgende. Nehmen wir an, daß die eine Gruppe von Tieren durch einen höheren Antikörperstoffwechsel ausgezeichnet sei, derart, daß schon auf die erste Bacilleninjektion hin von ihnen größere Mengen von Agglutininen produziert würden, als von den

---

1) Arch. f. Hyg., Bd. 64, p. 107 u. 108: „ . . . denn es geht daraus hervor, daß zwei Sera oder Seragemische bei gleichem Gehalt an Antikörpern und unter sonst gleichen Verhältnissen dennoch sehr verschiedene Eigenschaften besitzen können, je nach der Dauer der immunisatorischen Behandlung, durch welche sie erzeugt wurden.“

anderen Tieren, daß aber gleichzeitig auch die Zerstörungsgeschwindigkeit derselben eine entsprechend größere wäre. Die Aviditäten der Agglutinine würden dementsprechend hier von Anfang an höhere sein müssen, als bei den Paralleltieren mit geringerem Antikörperstoffwechsel, der Titer jedoch würde, da die stärkere Produktion durch eine stärkere Zerstörung paralysiert würde, zunächst bei beiden Gruppen von Tieren der gleiche sein können. Im Verlauf der weiteren Immunisierung wird nun schließlich jene Grenze erreicht, über die hinaus die Produktion der Antikörper nicht mehr zunimmt; diese Grenze wird aber von jenen Tieren, die schon von Anfang an mit großer Produktionsintensität eingesetzt haben, sicher viel früher erreicht werden, als von den Paralleltieren; mit anderen Worten, der Kurvengipfel wird hier früher eintreten müssen, was ja tatsächlich mit den Beobachtungen übereinstimmt. Der Kurvengipfel wird aber zugleich auch niedriger sein müssen, da ja, bei gleicher maximaler Antikörperproduktion hier die Zerstörung der Antikörper eine größere ist.

Es ist aber auch noch eine ganz andere Deutung möglich. Zweifellos wird, wenn, wie bei unseren Versuchen, stets mit gleich bleibenden Antigenmengen immunisiert wird, dann das Titermaximum erreicht werden, wenn die Reizschwelle durch Gewöhnung der Zellen an die betreffende Antigendosis so groß geworden ist, daß eine neuerliche Einverleibung derselben keinen neuen kräftigen Impuls zur Antikörperproduktion mehr setzt. Produziert nun ein Tier infolge seiner individuellen Eigentümlichkeiten von vornherein sehr avide Antikörper, so wird bei jeder Antigeninjektion ein sehr großer Bruchteil des Antigens im Blut absorbiert und so verhindert werden, mit den Antikörper produzierenden Organen in Berührung zu treten. Nur ein recht kleiner Bruchteil wird infolgedessen einen antigenetischen Reiz auf diese Organe ausüben können, und die Produktion wird bald zum Stillstand kommen, wobei der Serumtiter natürlich niedriger bleibt als bei einem anderen Versuchstiere, dessen zunächst wenig avide Antikörper auch wenig von dem Antigen unschädlich machen.

Endlich wäre noch eine dritte Möglichkeit zu erörtern, welche, wie die beiden vorhergehenden, die Annahme individueller Verschiedenheiten zwischen den einzelnen Versuchstieren zur Voraussetzung hat, aber auf etwas allgemeinen biologischen Prinzipien basiert, wenn sie sich auch zum Teil mit der zweitgenannten Deutung decken dürfte.

Wie P. Th. Müller in seiner Einleitung ausgeführt hat, kann man nämlich in der Aviditätssteigerung der Antikörper, die sich im Verlauf der Immunisierung einstellt, das Resultat eines Anpassungsvorganges der Zellen an das eingeführte Antigen stehen. Es steht nun der Annahme nichts im Wege, daß gerade hierin die individuellen Verschiedenheiten zu suchen sind, daß also ein Tier eine größere Anpassungsfähigkeit als ein anderes besitzt. Diese größere Anpassungsfähigkeit würde in der Produktion aviderer Antikörper bestehen, also in der Qualität derselben ihre Begründung finden und auch graphisch durch den höheren Verlauf der Aviditätskurve zum Ausdruck kommen.

Führt man nun verschiedenen Organismen Antigen zu, so wird derjenige, welcher imstande ist, avide Antikörper zu produzieren, einen Vorteil gegenüber den anderen besitzen, da er das Antigen leichter zu beseitigen vermag, und wird infolgedessen mit geringeren Antikörpermengen arbeiten können, als derjenige, welcher weniger avide Antikörper bildet und daher ceteris paribus mehr Einheiten aufbringen muß, um denselben Effekt zu erzielen.

Mit anderen Worten, die Menge der neu zu produzierenden Antikörper wird bei den anpassungsfähigeren Tieren eine geringere sein können, weil der Organismus vermöge seiner qualifizierteren Antikörper des Eingriffes leichter Herr wird. Dies muß aber wieder in den Titerkurven insofern zum Ausdruck kommen, als sie nicht jene hohen Werte erreichen werden, wie in denjenigen Fällen, wo der Organismus diese mangelnde Fähigkeit durch Mehrproduktion der Antikörper auszugleichen sucht.

Dementsprechend wird auch derjenige Organismus, der die besser angepaßten, d. i. avideren Antikörper liefert, früher

mit der Antikörperproduktion zum Stillstand kommen können, also früher den Gipfel seiner Titerkurven erreichen.

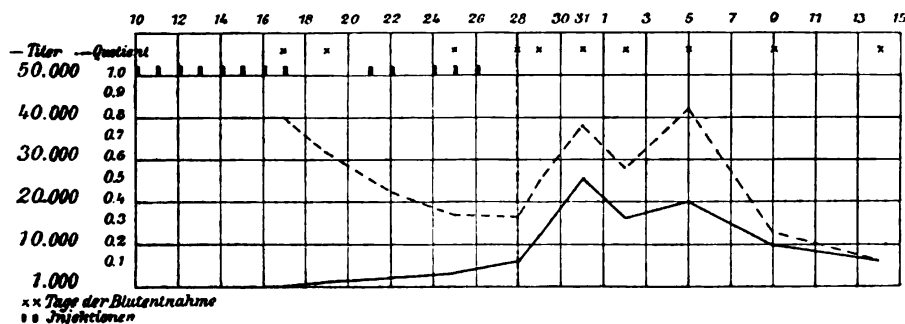
Welche dieser verschiedenen Möglichkeiten zu Recht besteht, wollen wir einstweilen unentschieden lassen. —

In Ergänzung der besprochenen Versuchsreihen habe ich noch ein Kaninchenpaar einer forcierten, d. h. durch tägliche Bakterieneinspritzungen bewirkten Immunisierung unterworfen, weil zu erwarten stand, daß hier der Organismus zu einer Art Maximalleistung oder wenigstens zu einer unverhältnismäßig energischeren Heranziehung aller zur Verfügung stehenden Schutzkräfte gezwungen würde, was weiterhin nicht ohne Einfluß auf die Art und Weise der Antikörperproduktion bleiben konnte und in den erhaltenen Titer- und Aviditätswerten zum Ausdruck kommen mußte.

Auch glaube ich nicht ganz mit Unrecht in dieser Art der Immunisierung eine gewisse Aehnlichkeit mit jener erblicken zu dürfen, wie sie im Verlaufe einer natürlichen Infektion entsteht, wo ja auch längere Zeit hindurch eine fortwährende Resorption von bakteriellen Antigenen stattfindet.

Der Versuch selbst wurde in der Art ausgeführt, daß den beiden Versuchstieren, wie aus den Tabellen ersichtlich ist, eine Reihe von 8 Injektionen in je 24-stündigen Intervallen einverleibt wurden, welche dann nach weiteren 4 Tagen 2mal und nach neuerlicher 2-tägiger Pause 3mal wiederholt wurden. Es wurde jedesmal die gleiche Menge, und zwar 0,3 unserer Bacillenaufschwemmung, mit Wasser verdünnt, injiziert.

Betrachten wir auch hier zunächst wieder den Versuch V. Aus der Kurve 5 ersehen wir sofort, daß wir zwei verschiedene Phasen zu unterscheiden haben, eine erste, welche



Kurve 5. Versuch V, Tier MIII.

noch unmittelbar unter dem Einfluß der Injektionen steht, und eine zweite, darauf folgende, bei welcher die störende Einwirkung der fortwährenden Antigenezufuhr fortfällt und der Organismus den in der früheren Periode gesetzten antigenetischen Reiz mit energischer Antikörperproduktion beantwortet.

In der graphischen Darstellung sind diese beiden Phasen durch eine senkrechte Linie getrennt.

## V. Versuch.

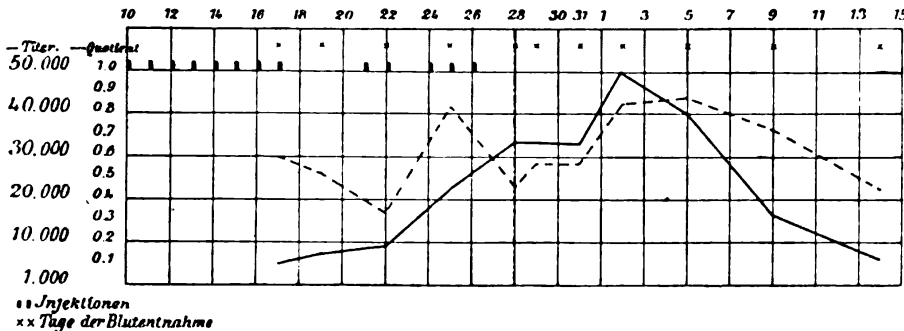
Tabelle V.

Tag der Injektion	Tag der Blutentnahme	Zeitintervall zwischen beiden	Agglutinin-einheiten des Vollserums resp. Titer	Agglutinin-einheiten, zur Absorption dargeboten	Quotient
10. V. 11. V. 12. V. 13. V. 14. V. 15. V. 16. V. 17. V.	13. V.		0		
21. V. 22. V. 24. V. 25. V. 26. V.	17. V. 19. V. 22. V. 25. V. 28. V. 29. V. 31. V. 2. VI. 5. VI. 9. VI. 14. VI.		250 1 000 2 000 3 333 6 666 12 500 25 333 16 666 20 000 10 000 6 666	250 625 500 555 513 502 500 505 500 500 500	0,80 0,64 0,45 0,34 0,33 0,50 0,77 0,56 0,83 0,26 0,12

Aus der Zahlentabelle V sehen wir, daß am 8. Versuchstage noch ein niedriger Serومتiter bestand, der sich zunächst nur langsam und ganz allmählig zu erheben vermochte und erst in der zweiten Phase einen rascheren Anstieg aufwies, indem er innerhalb von nur 2 Tagen von 12 000 auf 25 000 anwuchs und hiermit (am 21. Tage nach der ersten und 5 Tage nach der letzten Injektion) seinen höchsten Wert erreichte. Die anfangs relativ hohe Avidität bewegt sich als flache Kurve gegen die Abscissenachse, allmählich an Wert abnehmend, zeigt also

in dieser Phase keinen Parallelismus mit der Titerkurve. In der zweiten Phase tritt uns jedoch wieder die Kongruenz in völlig überzeugender Weise entgegen.

Der VI. Versuch zeigt, insbesondere bei Betrachtung der Kurve 6, insofern etwas andere Verhältnisse, als es hier noch



Kurve 6. Versuch VI, Tier MIV.

vor Ablauf der Injektionsperiode zu einem Anstieg beider Werte kommt, der sich auch noch bis in die letzte Periode

#### VI. Versuch. Zahlentabelle VI.

Tag der Injektion	Tag der Blutentnahme	Agglutinin-einheiten des Vollserums resp. Titerhöhe	Agglutinin-einheiten zur Absorption dargeboten	Quotient
10. V.				
11. V.				
12. V.				
13. V.	13. V.	10		
14. V.				
15. V.				
16. V.				
17. V.	17. V.	5 555	277	0,60
	19. V.	7 142	510	0,52
21. V.				
22. V.	22. V.	9 090	478	0,34
24. V.				
25. V.	25. V.	22 725	505	0,82
29. V.				
	28. V.	33 333	666	0,45
	29. V.	33 333	505	0,56
	31. V.	33 333	505	0,56
	2. VI.	50 000	500	0,86
	5. VI.	90 000	500	0,88
	9. VI.	16 665	500	0,72
	15. VI.	6 666	500	0,45

eine Zeit zu erhalten vermag, worauf dann die Kurven sich kreuzen, indem die Avidität bei steigendem Titer jäh absinkt. Darauf folgt zunächst eine stationäre Phase, in welcher beide Werte ziemlich unverändert bleiben, und schließlich ein gemeinsames Ansteigen beider Werte; der Gipfel wird 23 Tage nach der ersten und 7 Tage nach der letzten Injektion erreicht.

Das Wesentliche bei den beiden eben geschilderten Versuchen besteht also darin, daß erst einige Zeit nach dem Aufhören der täglichen Injektionen der uns von früher her bekannte Parallelismus von Titer- und Aviditätskurven einsetzt, während derselbe in der ersten Versuchsperiode, wo täglich neues Antigen zugeführt wird, beträchtlich gestört erscheint. — Nach den allerersten Injektionen zeigt sich nämlich durchwegs bei langsam ansteigendem Titer ein mäßiger Abfall der Aviditäten. Im Versuch VI schließt sich daran ein kurzer gemeinsamer Anstieg von Titer und Avidität, der dann aber wieder durch ein jähes Absinken der letzteren bei weiter steigendem Titer unterbrochen wird.

Es kann wohl kein Zweifel sein, daß diese Störungen als Wirkung der fortwährenden Antigenresorption anzusehen sein dürften. Denn durch den Uebergang von Antigen in das Blut werden gerade die avidesten Agglutininfraktionen absorbiert werden müssen, und es wird sowohl zu einer relativen Verminderung des Titers wie der Aviditäten kommen. Je nach dem quantitativen Verhältnis, welches zwischen diesen Absorptionsvorgängen und den Neubildungsvorgängen der Antikörper besteht, wird sich demgemäß der Verlauf unserer beiden Kurven abweichend von dem in unseren früheren Versuchen beobachteten gestalten müssen. In der Tat sehen wir, wie gesagt, daß denn auch die Aviditätskurven ein leichtes Absinken zeigen, während die Titerkurven, die wir früher sich rapid erheben sahen, diesmal nur langsam ansteigen. — Daß ferner durch schubweise einsetzende Resorptionsvorgänge der regelmäßige Verlauf der Kurven unterbrochen werden kann, ist leicht einzusehen.

Wenn wir früher bemerkten, daß wir in der geschilderten Versuchsanordnung vielleicht ähnliche Verhältnisse erblicken

dürfen, wie bei der auf natürlichem Wege entstehenden Immunisierung, so begründet sich dies zunächst in der Art des Versuches selbst und bleibt daher nur eine, wenn auch wahrscheinliche, Annahme. Nur auf eines möchte ich aufmerksam machen.

In einer gleichzeitig im hiesigen Institute ausgeführten Arbeit fand Dr. Rintelen, daß im Anschlusse an ein Typhusrecidiv die Avidität der Serumagglutinine absank, wogegen auffallenderweise der Titer anstieg. Ich möchte nun darauf hinweisen, daß auch bei unseren Tierversuchen (No. VI) einmal eine ähnliche Beobachtung gemacht wurde, indem unter dem Einflusse neuer Antigenezufuhr die Avidität abnahm, während der Titer sich erhöhte und ich glaube hierin eine gewisse Aehnlichkeit mit den Beobachtungen Rintelens erblicken zu dürfen.

Schließlich möchte ich mir vorbehalten, meine Untersuchungen in dem bisherigen Sinne fortzusetzen und speziell auf die späteren Phasen der Immunisierung auszudehnen.

#### Zusammenfassung.

1) Im Verlauf der Immunisierung steigert sich die Avidität der produzierten Agglutinine.

2) Bei Immunisierung mit gleichbleibenden, in regelmäßigen Abständen von 8—10 Tagen einverleibten Bakterien-dosen steigt der Serumtiter bis zu einer gewissen Höhe, um dann wieder abzusinken.

3) Die Aviditätskurve verläuft dabei im gleichen Sinne wie die Titerkurve, d. h. sie steigt, wenn die Titerkurve ansteigt, sie sinkt, wenn dieselbe absinkt. Auch kleinere Titterschwankungen sind dabei meist von entsprechenden Aviditätsschwankungen begleitet.

4) Dem Maximum der Titerkurven entspricht also das Maximum der Aviditäten.

5) Jene Tiere, welche von Anfang an höhere Aviditätswerte aufwiesen, scheinen — wenn unsere Befunde verallgemeinert werden dürfen — das Aviditätsmaximum früher und bei niedrigerem Titerstande zu erreichen, als solche Tiere, die mit geringen Aviditäten der Agglutinine einsetzen.



6) Sera von gleichem Titer können sehr verschiedene Aviditäten aufweisen.

7) Werden die Versuchstiere eine Zeitlang hindurch täglich injiziert, so zeigt sich der Parallelismus von Titerkurve und Aviditätskurve erst, nachdem die Injektionen ausgesetzt wurden und der Organismus nicht mehr unter dem Einfluß des fortwährend resorbierten Antigens steht.

8) Solange bei diesen forcierten Immunisierungsversuchen fortwährend neues Antigen zugeführt wird, zeigen die Titerkurven und Aviditätskurven Störungen, die nicht immer im selben Sinne verlaufen und wohl durch Absorptionsvorgänge an den in der Blutbahn kreisenden Antikörpern bedingt sind.

### III. Aviditätsstudien am Serum Typhuskranker.

Von Dr. August Rintelen,

Assistent der Grazer medizinischen Klinik.

In seinen Affinitätsstudien an Agglutininen konnte P. Th. Müller<sup>1)</sup> den Beweis erbringen, daß in demselben Immunsérum Antikörper verschiedener Avidität nebeneinander vorhanden sind. Diese Aviditätsdifferenzen sind einerseits darauf zu beziehen, daß in den verschiedenen Immunisierungsperioden Antikörper verschiedener Avidität gebildet werden und so nebeneinander existieren, andererseits darauf, daß in der Blutbahn eine Abschwächung der Affinitäten stattfindet, in der Art, daß Antikörper, die aus früheren Immunisierungsperioden stammen, in einem gegebenen Moment bereits stärker geschädigt sind, als solche jüngeren Ursprunges. Weitere Versuche ergaben, daß das Serum von Versuchstieren, die längere Zeit nicht immunisiert worden waren, nur sehr geringe Aviditäten zeigte, was sowohl mit der erwähnten Abschwächung der Affinitäten als auch mit der in dieser Phase der Immunisierung vor sich gehenden Neubildung von Antikörpern geringer Avidität zu erklären sein dürfte.

1) Arch. f. Hyg., Bd. 64, 1908; Centralbl. f. Bakt., Bd. 46, 1908.

Nach diesen Ergebnissen war es daher von Interesse zu untersuchen, wie sich die Antikörper im Serum von an Typhus abdominalis Erkrankten bezüglich ihrer Avidität im Verlaufe des Krankheitsprozesses verhalten, ob die Schwere der Erkrankung, die Dauer der Infektion in irgendwelcher Beziehung zur Avidität stehe, ob man hieraus irgendwelchen Schluß auf den weiteren Verlauf der Erkrankung ziehen könne usw. Von Wichtigkeit war besonders auch, zu prüfen, ob die Avidität irgendeinen Zusammenhang mit dem Fieber aufweise und wie sie sich beim Auftreten von Rezidiven oder von Komplikationen verhalte.

Ich leistete daher gern einer Anregung des Herrn Prof. P. Th. Müller, diese Verhältnisse bei Typhuskranken zu prüfen, Folge, muß jedoch gleich erwähnen, daß mir zwar kein großes Krankenmaterial zur Verfügung stand, daher die Zahl der Versuche nur eine sehr geringe ist, daß denselben aber ein außerordentlich einheitliches Material insofern zugrunde liegt, als dieselben anlässlich einer durch eine Wärterin eingeschleppten Hausepidemie gemacht wurden, die Infektionsquelle daher bei fast allen Kranken die gleiche gewesen ist.

Bevor ich auf die Untersuchungsergebnisse näher eingehe, möchte ich im folgenden kurz die wichtigsten Daten über den Verlauf der einzelnen Fälle anführen und gleichzeitig die beobachteten Absorptionsquotienten mitteilen.

I. Str., Johann, 14 Jahre, erkrankte am 29. I. 1909 mit Schüttelfrost, Erbrechen, Abführen und Kopfschmerzen. Diazoreaktion positiv. Vidal 1:320 positiv. Kein Rezidiv. Ab 18. II. fieberfrei. Am 21. III. geheilt entlassen.

1. Venaepunktion: 27. II. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{533-503}{533} = 0,05$$

2. Punktion: 10. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{400-352}{400} = 0,1$$

3. Punktion: 20. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{246-176}{246} = 0,28$$

II. H., Josefa, 31 Jahre, Wärterin, erkrankte Anfang Februar unter Frösteln, Kopfschmerzen und Schwindelanfällen. Diazo positiv. Vidal

1:160 positiv. Rezidiv am 2. III. 09, ab 19. III. fieberfrei, am 17. IV. geheilt entlassen. Keine Komplikationen.

1. Venaepunktion: 1. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{200-31}{200} = 0,84$$

2. Punktion: 16. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{5120-1408}{5120} = 0,72$$

$$\text{Absorptionsquotient (10-fach verd. Ser.)} = \frac{512-137}{512} = 0,73$$

III. Tr., Agnes, 25 Jahr, Wärterin, erkrankte am 1. II. 1909 mit Fieber, Mattigkeit, Frösteln, Appetitlosigkeit und Obstipation. Diazo positiv. Leukocyten: 4900. Vidal 1:320. Fieberfrei seit 9. III. 1909, am 8. IV. geheilt entlassen. Rezidiv am 1. III. Keine Komplikationen.

1. Venaepunktion: 2. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{355-12}{355} = 0,97$$

2. Punktion: 11. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{533-146}{533} = 0,72$$

IV. E., Rudolf, 15 Jahre, Hilfsarbeiter, erkrankte auf der chirurgischen Abteilung (Verletzung) am 29. I. 1909 mit Fieber, Kopfschmerzen, Diarrhöen. Diazoreaktion: negativ. Leukocyten: 4800. Vidal 1:1280. Rezidiv am 9. II., fieberfrei seit 7. III., am 8. IV. geheilt entlassen. Keine Komplikationen.

1. Venaepunktion: 3. III. 1909.

$$\text{a) Absorptionsquotient} = \frac{3200-781}{3200} = 0,75$$

$$\text{b) Absorptionsquotient (2-fach verd. Ser.)} = \frac{1600-293}{1600} = 0,8$$

$$\text{c) Absorptionsquotient (4-fach verd. Ser.)} = \frac{800-73}{800} = 0,91$$

2. Punktion: 23. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{100-22}{100} = 0,88$$

3. Punktion: 14. IV. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{33-4,4}{33} = 0,87$$

V. S., Andreas, 13 Jahre, Tagelöhnerssohn, erkrankte Mitte März mit Fieber und Kopfschmerzen. Diazo positiv, Leukocyten 10 400. Vidal 1:640. Kein Rezidiv, keine Komplikationen, seit 5. IV. 1909 fieberfrei, am 25. IV. geheilt entlassen.

1. Venaepunktion: 27. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{800-50}{800} = 0,9$$

2. Punktion: 15. IV. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{800-704}{800} = 0,12$$

VI. S., Franziska, 20 Jahre, Wärterin, erkrankte am 18. III. 1909 unter Fieber, Mattigkeit, Kopfschmerzen. Diazo: positiv. Leukocyten 4800. Vidal: 1:40. Am 5. IV. stärkeres Erbrechen. Puls klein, sehr frequent, Schüttelfrost, starker Meteorismus, hämorrhagische Stühle. Kein Rezidiv.

1. Venaepunktion: 27. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{57-31}{57} = 0,45$$

VII. Sp., Alvinia, 19 Jahre, Wärterin, erkrankte am 2. III. 1909 unter Magenschmerzen, Erbrechen, Schwindel und leichtem Fieber. Diazo: positiv. Gruber-Vidal: 1:160. Rezidiv am 13. IV. 1909, seit 25. IV. fieberfrei. Keine Komplikation, am 25. V. 1909 geheilt entlassen.

1. Venaepunktion: 6. IV. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{355-160}{355} = 0,54$$

2. Punktion: 7. V. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{400-58}{400} = 0,85$$

VIII. W., Anton, 58 Jahre, Steinbrecher, erkrankte auf der chirurgischen Abteilung (Verletzung) am 1. II. 1909 mit Schüttelfrösten, Schmerzen im Abdomen. Diazo: negativ. Gruber-Vidal: 1:320, Rezidiv am 10. III., seit 26. III. fieberfrei, am 20. IV. 1909 geheilt entlassen. Keine Komplikationen.

1. Venaepunktion: 4. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{228-12}{228} = 0,94$$

2. Punktion: 15. III. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{640-586}{640} = 0,09^1)$$

3. Punktion: 20. IV. 1909.

$$\text{Absorptionsquotient} = \frac{457-292}{457} = 0,36$$

Aus diesen Untersuchungsergebnissen ersehen wir vor allem, daß sich, wie man nach den Tierversuchen P.Th.Müllers erwarten konnte, im Serum Typhuskranker zu ver-

1) Diese Bestimmung wurde mit dem gleichen Resultat wiederholt, kann also nicht auf Versuchsfehler zurückzuführen sein.

schiedenen Zeiten Antikörper verschiedener Avidität nachweisen lassen. Ob es sich auch hier, beim erkrankten Menschen, um analoge gesetzmäßige Aenderungen der Aviditäten handelt, wie sie beim Tier im Verlaufe der Immunisierung beobachtet wurden, war an dem vorliegenden Material nicht zu entscheiden. Dies war ja aber auch nicht der Zweck obiger Versuche, es sollte ja nur, wie bereits eingangs erwähnt, geprüft werden, ob und in welchem Zusammenhange die Aviditätsverhältnisse der Agglutinine mit dem klinischen Verlaufe des Typhus abdominalis stehen.

P. Th. Müller fand, wie schon früher erwähnt, nach längerem Aussetzen der Immunisierung eine deutliche Abnahme der Avidität. Es war daher wohl auch bei den Kranken zu erwarten, daß ihr Serum längere Zeit nach der Entfieberung eine Abnahme der Avidität zeigen werde. Ob diese Vermutung sich bestätigt, lehrt ein Blick auf folgende Tabelle, in der ich die Verhältnisse der einzelnen Absorptionsquotienten im Vergleiche zur Dauer der Erkrankung zusammengestellt habe.

Fall	Zeit der Versuche	Dauer der Krankheit	Serumtiter	Absorptionsquotient
I	27. II.	4 Wochen	533	0,05
	10. III.	6 "	400	0,1
	20. III.	8 "	246	0,28
II	1. III.	4 "	200	0,84
	16. III.	6 "	5120	0,72
III	2. III.	5 "	355	0,97
	12. III.	7 "	533	0,72
IV	3. III.	5 "	3200	0,75 (0,9)
	23. III.	8 "	100	0,88
	14. IV.	11 "	33	0,87
V	27. III.	2 "	800	0,9
	15. IV.	5 "	800	0,12
VI	27. III.	2 "	57	0,45
	?	?	?	?
VII	6. IV.	2 Wochen	355	0,54
	7. V.	9 "	400	0,85
VIII	4. III.	3 "	228	0,94
	15. III.	5 "	640	0,09
	20. IV.	10 "	457	0,36

Aus dieser Tabelle ersehen wir, daß mit Ausnahme von Fall V und VIII, solange mir die Untersuchung des Serums möglich gewesen ist, eine beträchtliche Abnahme der Avidität innerhalb der angegebenen Zeit nicht stattgefunden hat, wenn auch bei Fall II, III und IV ein leichtes Sinken des Quotienten nicht zu verkennen ist. Besonders bei Fall IV ist die Aviditätsabnahme de facto eine größere, als in dem Absorptionsquotienten zum Ausdruck kommt, weil der Titer des Serums und damit die zur Absorption verwendeten Agglutininmengen zu Ende des Versuches ganz bedeutend niedriger waren als zu Anfang, und daher, den bekannten Beobachtungen von Volk und Eisenberg entsprechend, die Absorption relativ stärker i. e. vollständiger ausfallen mußte. Was nun die Fälle V und VIII anbelangt, bei welchen ein stärkeres Sinken der Aviditäten beobachtet wurde, so kann ich nicht unerwähnt lassen, daß dieselben klinisch das Bild einer leichten Infektion boten, während besonders Fall IV, dessen Quotient noch in der 11. Woche relativ hoch gewesen, klinisch den Eindruck einer schweren Erkrankung machte. Es scheint also nur bei leichteren Formen des Typhus zu einem raschen Abfall der Aviditäten zu kommen.

Ich hatte nun, da die Zeit, während der die Patienten im Spital bleiben mußten, eine so kurze war, die Absicht, deren Serum weitere 4 Wochen nach der Spitalsentlassung wieder auf die Avidität der Agglutinine zu prüfen. Da jedoch trotz meiner Aufforderung keiner der Patienten sich nach dieser Zeit wieder eingefunden hatte, war mir leider eine neuerliche Untersuchung des Serums unmöglich.

Vergleichen wir nun weiter, wie sich die Aviditäten der Agglutinine zu der Schwere der Erkrankung verhalten, so ergibt sich schon aus der geringen Anzahl der Fälle, die mir zur Verfügung stand, wie wir gleich aus der folgenden kurzen Zusammenstellung sehen werden, eine gewisse Beziehung.

Infektion	Fall	Durchschnittlicher Absorptions- quotient	Verhalten der Absorptionsquotienten
schwer	II, III, IV, VII	0,77	länger andauernd groß
leicht	I, V, VIII	0,35	klein oder bald kleiner werdend

Während wir also bei den schweren Infektionen durchwegs ziemlich hohe Avidität und, wie wir schon früher kurz erwähnt, dieselbe auch verhältnismäßig lange erhalten finden, sehen wir bei den leichter verlaufenden Erkrankungen, daß die Avidität der Agglutinine entweder überhaupt keine bedeutende ist, oder doch in einer Zeit, in der sie sich bei den schweren Fällen fast gar nicht verändert, bedeutend sinkt. Diese Tatsache läßt sich vielleicht damit erklären, daß man sich vorstellt, daß der Immunisierungsreiz bei den schweren Fällen ein viel länger andauernder ist, so daß eben infolge der fortwährenden Anwesenheit von Bacillen, i. e. von Antigenen im Organismus viel längere Zeit hindurch Antikörper gebildet werden, während bei den leichter und schneller verlaufenden Infektionen die Antikörperproduktion infolge des frühzeitigen Schwindens der Antigene eher aufhört. Im Zusammenhang damit wäre anzunehmen, daß gleichzeitig bei den schwereren Krankheitsformen die Antikörperproduktion von vornherein eine viel intensivere ist, worauf den Anschauungen Müllers entsprechend der Unterschied gegenüber dem Verhalten der Aviditäten bei den leichteren Krankheitsfällen zurückzuführen wäre.

Wenn also hiernach eine Beziehung zwischen der Schwere des Krankheitsprozesses und der Höhe der Aviditäten zweifellos zu bestehen scheint, so scheint andererseits der Höhe und Dauer des Fiebers kein wesentlicher Einfluß zuzukommen. Ich will hier kurz die Temperaturen zur Zeit der Blutentnahme den Absorptionsquotienten gegenüberstellen.

I. Zur Zeit des Fiebers keine Blutentnahme.				
II.	1. III. 1909	38,6°	Absorptionsquotient	= 0,84
	16. III. 1909	36,7°	"	= 0,72
III.	2. III. 1909	38,6°	"	= 0,97
	12. III. 1909	36,0°	"	= 0,72
IV.	3. III. 1909	37,6°	"	= 0,9
	23. III. 1909	36,7°	"	= 0,88
	14. IV. 1909	36,5°	"	= 0,87
V.	27. III. 1909	38,7°	"	= 0,9
	15. IV. 1909	36,3°	"	= 0,12
VI.	27. III. 1909	40,1°	"	= 0,45
	?	?	"	?
VII.	6. IV. 1909	36,9°	"	= 0,54
	7. V. 1909	36,3°	"	= 0,85
VIII.	4. III. 1909	36,4°	"	= 0,94
	15. III. 1909	38,0°	"	= 0,09
	20. IV. 1909	36,5°	"	= 0,36

Wir sehen aus dieser Zusammenstellung, daß bei den schwer verlaufenden Fällen (II, III, IV) ein Zusammenhang zwischen Temperatur und Avidität anscheinend nicht besteht. Sowohl am Anfang wie auch nach mehreren Wochen (6 bei Fall IV) der fieberfreien Zeit war eine Abnahme der Avidität noch nicht festzustellen. Fall VII, der auch ziemlich schwer verlaufen ist, zeigt uns nach einer längeren fieberfreien Periode sogar einen höheren Absorptionsquotienten, eine Aviditätssteigerung, die jedoch mit größter Wahrscheinlichkeit auf ein kurz vorher eingetretenes Rezidiv zurückzuführen sein dürfte.

Und damit komme ich auf die, wie mir scheint, interessanteste Frage, nämlich auf den Einfluß der Rezidive, zu sprechen.

Bei Fall VII finden wir, wie gesagt, nach dem am 13. April beginnenden Rezidiv am 7. Mai (also nach 4 Wochen) einen erhöhten Absorptionsquotienten. Fall II und III dagegen zeigen 14 resp. 10 Tage nach Beginn des Rezidives eine geringe Abnahme. Bei diesen Fällen, bei denen die Untersuchung erst relativ lange nach Eintritt des Rezidives vorgenommen wurde, zeigt sich also nichts besonders Auffallendes. Von größerer Bedeutung scheint mir jedoch diesbezüglich Fall VIII. Hier finden wir 7 Tage vor Beginn der neuerlichen Temperatursteigerung einen Absorptionsquotienten von 0,94. Am 11. März trat das Rezidiv auf, 4 Tage später finden



wir einen auffallend niederen Absorptionsquotienten (0,09), der im weiteren Verlaufe wieder angestiegen ist (am 20. April = 0,36). Wie wollen wir uns nun dieses Verhalten erklären? Am nächstliegenden wäre es vielleicht, anzunehmen, daß es beim Auftreten eines Rezidives neuerlich zu einer Ueberschwemmung des Blutes mit Typhusbacillen kommt und die avidesten der im Blutserum kreisenden, von früher her gebildeten Antikörper von den im Blute befindlichen Typhusbacillen zum Teil absorbiert werden, wodurch eine Abnahme der durchschnittlichen Aviditäten bedingt wäre. Sollte diese Annahme richtig sein, so wäre auch die in späterer Zeit, nach Auftreten des Rezidives gefundene Zunahme des Absorptionsquotienten, resp. der Avidität unschwer zu erklären, da wir ja diese Bacillenüberschwemmung nur als neuen Immunisierungsreiz aufzufassen brauchten. Daß gerade zur Zeit der niedrigen Aviditäten ein relativ hoher Serumtiter gefunden wurde, braucht dieser Auffassung nicht zu widersprechen (siehe die einleitenden Bemerkungen von P. Th. Müller).

Jedenfalls wäre die Bestätigung dieser Vermutung auch von hohem klinischen Werte, da man ja nicht ohne weiteres jede neuerliche Temperatursteigerung gleich als Symptom eines Rezidives auffassen kann und die Diagnose des Rezidives durch den Nachweis des Kleinerwerdens des Absorptionsquotienten im Beginne des Rezidives eine gewisse Stütze bekäme.

Ob auch zwischen Komplikationen im Verlaufe des Typhus und der Avidität ein Zusammenhang besteht, das zu untersuchen bot sich mir bis jetzt keine Gelegenheit. Sehr interessant wäre es gewiß, das Verhalten der Avidität, besonders bei Komplikationen, die auf eine Mischinfektion zurückzuführen sind, zu prüfen. Ich hoffe auch, daß sich mir Gelegenheit bieten wird, bei meinen weiteren diesbezüglichen Untersuchungen über die soeben aufgeworfene Frage berichten zu können.

### Zusammenfassung.

1) Die schweren Erkrankungsformen zeichneten sich durchschnittlich durch hohe Avidität der Agglutinine aus.

2) Ein Zusammenhang zwischen Schwere der Erkrankung und Avidität der Agglutinine war beim Typhus auch insofern zu finden, als bei den schwereren Erkrankungen noch lange Zeit nach der Entfieberung relativ hohe Aviditäten bestehen blieben, während dieselben bei leichten Fällen früher abzusinken begannen.

3) Hingegen schien den zur Zeit der Blutentnahme herrschenden (fieberhaften) Körpertemperaturen kein bestimmender Einfluß auf die Aviditätsverhältnisse zuzukommen.

4) Was schließlich die Rezidive anbelangt, so konnte in einem Falle in den ersten Tagen des Rezidives ein deutliches Sinken der Avidität mit darauffolgendem neuerlichen Anstieg beobachtet werden.

Jedenfalls ist aber die Zahl der untersuchten Fälle eine viel zu geringe, um sich ein endgültiges Urteil über die Aviditätsverhältnisse im Serum Typhuskranker bilden zu können, daher die Untersuchungen noch fortgesetzt werden müssen.

---

Schließlich möchte ich auch an dieser Stelle Herrn Dr. Josef Knappitsch, Primarius der II. medizinischen Abteilung am hiesigen allgemeinen Krankenhause, für die freundliche Ueberlassung der weiblichen Typhuskranken zu diesen Untersuchungen meinen besten Dank aussprechen.

---

#### IV. Aviditätsstudien an schwer agglutinierbaren Typhusbacillen.

Von Professor Paul Th. Müller.

##### I.

In einer im Jahre 1903 publizierten Arbeit<sup>1)</sup> hatte ich gezeigt, daß man durch fortgesetzte Züchtung von Typhusbacillen in einer mit Typhusimmunserum versetzten Bouillon eine Bakterienrasse erhält, welche sich nicht nur durch verminderte Agglutinierbarkeit von der Ausgangskultur unterscheidet, sondern auch bedeutend weniger Agglutinin zu ab-

---

1) Münchner med. Wochenschr., 1903.

sorbieren vermag. Diese Tatsache ist seither von verschiedenen Seiten vollkommen bestätigt worden [Hirschbruch<sup>1)</sup>, Kirstein<sup>2)</sup>].

Ich habe diese Abnahme der Bindungsfähigkeit, die unter dem Einfluß des Immunserums bei den Typhusbacillen eintritt, seinerzeit als „Rezeptorenschwund“, also als Verminderung der Agglutinin bindenden Stoffe in den Bakterienleibern gedeutet, eine Annahme, die durch mancherlei Tatsachen gestützt wurde und ganz im Sinne der damaligen Fassung der Ehrlichschen Theorien gelegen war. Die verschiedenen — zum Teil von mir selbst herrührenden — Aviditätsstudien der letzten Jahre legen nun aber den Gedanken nahe, daß eine ganze Reihe von Beobachtungen, die man bisher als Vermehrung oder Verminderung der bindenden Substanzen, der Rezeptoren nach Ehrlichs Terminologie, gedeutet hat, vielleicht besser auf Aviditätsänderungen bezogen werden können.

Es schien mir nun in dieser Richtung zunächst von Interesse, festzustellen, wie sich die beiden durch ihre Agglutinierbarkeit und ihr Agglutininbindungsvermögen voneinander verschiedenen Bakterienrassen beim Absorptionsversuche verhalten.

Zu meinen Versuchen benutzte ich den Typhusstamm des Laboratoriums, welcher im Mai und Juni 1908 12mal auf Bouillon übertragen worden war, die mit hochwirksamem Typhusimmunserum vom Pferde versetzt war. Hierauf blieben die Kulturen die Sommermonate über unberührt stehen, um erst im Oktober wieder weiter auf Typhusserum-Bouillon überimpft zu werden.

Die Agglutinierbarkeit der so erhaltenen Typhusbacillenrasse (die wir im weiteren durchweg als TyS bezeichnen wollen, d. i. als Typhus-Serum, im Gegensatz zu dem auf Bouillon gezüchteten Originalstamm TyB) wurde gegenüber verschiedenen, mir zur Verfügung stehenden Immunseren geprüft, und ergab folgende Titerzahlen:

---

1) Archiv f. Hyg., Bd. 56, 1906.

2) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 46, 1904.

Typhusserum I (vom Pferd; in verdünntem Zustand):	TyB	12 800
	TyS	2 560
Typhusserum II (Pferd, unverdünnt)	: TyB	1 200 000
	TyS	20 000
Typhusserumgemisch (Kaninchen) über 1 Jahr alt	: TyB	3 200
	TyS	0
Typhusserum (Kaninchen) 2 Injektionen TyB	: TyB	> 2048
	TyS	16

Die Versuche wurden nun in folgender Weise an-  
gestellt.

Es wurden verschiedene Verdünnungen des betreffenden Typhusimmunserums je mit dem gleichen Volumen der Bacillenaufschwemmungen TyB bzw. TyS versetzt und nach längerem Kontakt zentrifugiert. Die von dem Bodensatz abgegossenen klaren Flüssigkeiten wurden dann neuerdings gegen beide Bakterienrassen austitriert, wobei die Verdünnungen meist nach steigenden Potenzen von 2 angelegt wurden. Bezüglich der Ausführung der Agglutinationsreaktionen muß noch folgendes bemerkt werden.

Zu allen Experimenten wurden Massenkulturen beider Bacillenrassen auf Agar benützt, die in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und durch Zusatz von  $\frac{1}{2}$  Proz. Karbolsäure konserviert wurden.

Bei dem TyB-Stamm, dem leicht agglutinierbaren Stamm des Laboratoriums, trat die Agglutination außerordentlich prompt ein und war nach längstens 2 Stunden andauerndem Aufenthalt der Proben im Brutschrank vollkommen abgeschlossen. Ganz anders bei dem schwer agglutinablen Stamm TyS. Hier trat die Ausflockung besonders in den stärkeren Verdünnungen nur äußerst zögernd ein, war meist erst nach 6 Stunden überhaupt festzustellen und erst nach 12–18 Stunden vollendet. Da ferner die Ausflockung bei diesem Stamme weit weniger voluminös war, als bei TyB — wir kommen gleich auf diese Tatsache zurück — so war die Grenzbestimmung des Titors hier wesentlich erschwert und besonders bei den Absorptionsversuchen mit verdünntem Serum, in dem ja infolge der Bindung an die Bakterien, nur geringe Mengen von Agglutininen, und zwar von minimaler Avidität, zurückgelassen wurden,

mit gewissen Unsicherheiten behaftet<sup>1)</sup>. Dies ist der Grund, weshalb bei der im Anschluß an die folgenden Versuchsprotokolle gegebenen Diskussion der Resultate nur die Experimente mit konzentriertem und wenig verdünntem Serum berücksichtigt wurden, bei welchen ja die erwähnte Fehlerquelle, wenn auch nicht vollkommen ausgeschaltet ist, so doch weniger in Betracht kommt und eine schärfere Grenzbestimmung möglich ist.

In den nachstehenden Protokollen sind nun folgende Größen aufgeführt:

- 1) die Titerzahlen der Sera vor und nach der Absorption mit TyB und TyS;
- 2) die Zahl der bei der Absorption zu Verlust gegangenen Agglutinineinheiten;
- 3) das Verhältnis der absorbierten Agglutinineinheiten für TyB zu denen für TyS;
- 4) die Absorptionsquotienten für TyS und TyB;
- 5) das Verhältnis der Titerzahlen für TyB und TyS vor und nach der Absorption.

#### Absorptionsversuch I.

Typhuspferdeserum II. — Die Absorption wurde in folgenden Mengenverhältnissen vorgenommen:

a) 1 ccm Vollserum	+ 1 ccm TyB
1 " "	+ 1 " TyS
b) 2 ccm Serum 10-fach verdünnt	+ 2 ccm TyB
2 " " 10- " "	+ 2 " TyS
c) 2 ccm Serum 100-fach verdünnt	+ 2 ccm TyB
2 " " 100- " "	+ 2 " TyS
d) 2 ccm Serum 1000-fach verdünnt	+ 2 ccm TyB
2 " " 1000- " "	+ 2 " TyS
e) 2 ccm Serum 10 000-fach verdünnt	+ 2 ccm TyB
2 " " 10 000- " "	+ 2 " TyS

Nach 12-stündigem Kontakt bei Zimmertemperatur werden die Proben zentrifugiert, die Flüssigkeiten abgegossen und ihre Wirksamkeit den beiden Ty-Rassen gegenüber ausprobiert.

Dabei ergaben sich folgende Resultate:

Wirkung des Vollserums auf TyS: 20 000  
 " " " " TyB: 1 200 000.

- 1) Es liegt in der Natur der Sache, daß die Grenzwerte der Agglutination für TyS bei den Versuchen mit stark verdünntem Serum aus obigen Gründen sämtlich zu niedrig ausfallen müssen.

	Absorption mit TyS		Absorption mit TyB	
	Wirkung auf TyB	Wirkung auf TyS	Wirkung auf TyB	Wirkung auf TyS
Vollserum	25 600	6400	25 600	3200
10-fach verdünnt	5 120	256	256	128
100- „ „	256	4	0	0
1 000- „ „	4	0	0	0
10 000- „ „	0	0	0	0

Anmerkung: Die schwächste geprüfte Verdünnung war stets 1 : 2.

#### Zahl der absorbierten Agglutinineinheiten.

Serum- verdünnung	I Absorption mit TyS		II Absorption mit TyB	
	a gegen TyB	b gegen TyS	a gegen TyB	b gegen TyS
0	1 148 800	7200	1 148 800	13 600
10	109 760	1488	119 488	1 744
100	11 488	192	—	—

Verhältnis der absorbierten TyB:TyS-Agglutinineinheiten einerseits bei Absorption mit TyS, andererseits mit TyB (d. i.  $\frac{Ia}{Ib}$  und  $\frac{IIa}{IIb}$ ).

Serum- verdünnung	I Absorption mit TyS	II Absorption mit TyB
0	159	84
10	73	68
100	59	—

#### Absorptionsquotienten.

Verdünnung	Absorption mit TyS		Absorption mit TyB	
	gegen TyS	gegen TyB	gegen TyS	gegen TyB
0	0,36	0,96	0,68	0,96
10	0,74	0,91	0,87	0,99
100	0,96	0,96	1,0	1,0
1 000	1,0	0,99	1,0	1,0
10 000	1,0	1,0	1,0	1,0

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. III.

19

Verhältnis der Wirksamkeit der Sera auf TyB und TyS  
vor und nach der Absorption.

Vor Absorption:  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 60.$

Verdünnung	nach Absorption mit TyS	nach Absorption mit TyB
Vollserum	4	8
10-fach verdünnt	20	2
100- „ „	64	—

Absorptionsversuch II.

Typhuspferdeserum II.

- a) 1 ccm Vollserum + 1 ccm TyB  
 1 „ „ + 1 „ TyS  
 b) 2 ccm Serum 10-fach + 2 ccm TyB  
 2 „ „ 10- „ + 2 „ TyS  
 c) 2 ccm Serum 50-fach + 2 ccm TyB  
 2 „ „ 50- „ + 2 „ TyS  
 d) 2 ccm Serum 100-fach + 2 ccm TyB  
 2 „ „ 100- „ + 2 „ TyS

Sonst wie bei Versuch I.

Ergebnis der Titration nach vollzogener Absorption.

	Absorption mit TyS		Absorption mit TyB	
	Wirkung auf TyB	Wirkung auf TyS	Wirkung auf TyB	Wirkung auf TyS
Vollserum	102 400	6400	25 600	3200
10-fach verdünnt	5 120	128	512	256
50- „ „	1 024	4	4	4
100- „ „	256	2	0	4

Anmerkung: Die schwächste geprüfte Verdünnung war stets 1 : 2.

Verhältnis der Wirksamkeit der Sera auf TyB und TyS  
vor und nach Absorption.

Vor Absorption:  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 60.$

Verdünnung	nach Absorption mit TyS	nach Absorption mit TyB
Vollserum	16	8
10-fach	40	2
50- „	256	1
100- „	128	—

## Zahl der absorbierten Agglutinineinheiten.

Serum- verdünnung	I Absorption mit TyS		II Absorption mit TyB	
	a gegen TyB	b gegen TyS	a gegen TyB	b gegen TyS
0	995 200	7200	1 148 800	13 600
10	109 760	1744	118 976	1 488
50	21 952	392	23 992	392
100	11 488	196	12 000	192

Verhältnis der absorbierten TyB:TyS Agglutinineinheiten  
einerseits bei Absorption mit TyS, andererseits mit TyB (d. i.  $\frac{Ia}{Ib}$  und  $\frac{IIa}{IIb}$ ).

Serum- verdünnung	I Absorption mit TyS	II Absorption mit TyB
0	138	84
10	63	79
50	56	61
100	58	—

## Absorptionsquotienten.

Verdünnung	Absorption mit TyS		Absorption mit TyB	
	gegen TyB	gegen TyS	gegen TyB	gegen TyS
0	0,82	0,36	0,95	0,68
10	0,91	0,87	0,99	0,74
50	0,91	0,98	0,99	0,96
100	0,95	0,93	1,0	0,96

## Absorptionsversuch III.

Ty-Pferdeserum III.

- a) 1 ccm Vollserum + 1 TyS  
 1 „ „ + 1 TyB  
 b) 2 ccm Serum 10-fach + 2 ccm TyS  
 2 „ „ 10-fach + 2 „ TyB  
 c) 2 ccm Serum 100-fach + 2 ccm TyS  
 2 „ „ 100-fach + 2 „ TyB

Nach 12-stündigem Kontakt zentrifugiert.

Resultat der Titration: Vor Absorption: TyS: 160 000  
 TyS: 8 000

19\*



	Absorption mit TyS		Absorption mit TyB	
	Wirkung auf TyS	Wirkung auf TyB	Wirkung auf TyS	Wirkung auf TyB
Vollserum	3200	48 000	3200	25 600
10-fach verd.	256	3 840	256	512
100-fach verd.	4	64	2	4

## Zahl der absorbierten Agglutinineinheiten.

Verdünnung	I Absorption mit TyS		II Absorption mit TyB	
	a	b	a	b
	gegen TyB	gegen TyS	gegen TyB	gegen TyS
0	64 000	1600	108 800	1600
10	8 320	288	14 976	288
100	1 472	72	1 592	76

Verhältnis der absorbierten Agglutinineinheiten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$

d. i.  $\frac{\text{I a}}{\text{I b}}$  und  $\frac{\text{II a}}{\text{II b}}$  (vor Absorption = 20)

Verdünnung	I	II
0	40	68
10	28	52
100	20	20

## Absorptionsquotienten.

Verdünnung	Absorption mit TyS		Absorption mit TyB	
	gegen TyS	gegen TyB	gegen TyS	gegen TyB
0	0,2	0,2	0,2	0,68
10	0,36	0,52	0,36	0,93
100	0,9	0,92	0,95	0,99

Verhältnis der Wirksamkeit der Sera auf TyB und TyS  
vor und nach Absorption.

Vor Absorption  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 20$ .

Verdünnung	nach Absorption mit TyS	nach Absorption mit TyB
0	15	8
10	15	2
100	16	2

Was nun die Ergebnisse dieser Versuche betrifft, so zeigen dieselben zunächst wieder jene, schon in meiner Arbeit vom Jahre 1903 beschriebene und seither von anderer Seite mehrfach bestätigte Abnahme der Bindungsfähigkeit der Typhusbacillen für die Agglutinine, die unter dem Einfluß fortgesetzter Serumpassagen zustande kommt. Dieselbe äußert sich darin, daß bei Absorption mit TyS der Serumtiter weniger stark herabgesetzt wird, als bei Absorption mit TyB, ein Unterschied, der übrigens bei der Titration gegen TyB weit stärker und regelmäßiger zutage tritt, als bei der Wertbestimmung gegen TyS.

Nicht uninteressant ist nun, daß die verminderte Bindungsfähigkeit der TyS-Bakterien auch noch in anderer, direkt augenfälliger Weise zum Ausdruck kommt. Vergleicht man nämlich die mit gleichen Serumverdünnungen hergestellten Agglutinationsproben von TyB und TyS, nachdem sich die Bakterien abgesetzt haben, so fällt sofort auf, daß der Niederschlag in den ersteren bedeutend mächtiger ist, als in den letzteren; schüttelt man die Röhrchen auf, so zeigen sich diejenigen, welche TyB enthalten, weit stärker getrübt, als die mit TyS beschickten. In der folgenden kleinen Tabelle habe ich, um einen annähernden Begriff von den hierbei beobachteten Unterschieden zu geben, die Höhe der entstandenen Niederschläge (die vor und nach dem Zentrifugieren in engen Röhrchen bestimmt wurde) in Millimetern aufgezeichnet.

Versuch	Serum- verdünnung	Höhe des Niederschlags vor Zentrifugieren		Höhe des Niederschlags nach Zentrifugieren	
		TyS	TyB	TyS	TyB
a	10	5	29	1	5
	100	4	16	1	5
	1 000	3	27	1	5
	10 000	3	41	1	5
b	0	4	20	2	5
	10	5	15	2	5
	50	5	13	2	5
	100	4	11	2	5
c	0	4	19	1	3
	10	5	40	1	6
	50	4	45	1	6
	100	4	45	2	6

Man kann hieraus entnehmen, daß tatsächlich die Menge des entstandenen Niederschlages — d. i. der agglutinierten Bakterien + dem von ihnen absorbierten Agglutinin bzw. demjenigen Bestandteil des Serums, an dem das Agglutinin haftet, bei der Verwendung von TyB viel größer ist, als bei Verwendung von TyS. Da nun aber bei beiden Proben so ziemlich die gleichen Bakterienmengen zu dem Serum hinzugefügt wurden, so ist klar, daß die beobachteten Unterschiede nur daher rühren können, daß eben von den TyB-Bakterien größere Mengen von Serumbestandteilen in den Niederschlag mitgerissen bzw. absorbiert werden, als von den weniger bindungsfähigen TyS-Bakterien. — Dieselbe Tatsache kann man übrigens beobachten, wenn man an Stelle der Bakterienleiber Bakterienextrakte, die nach der von Bassenge<sup>1)</sup> beschriebenen Lecithinmethode hergestellt wurden, mit Immunserum zusammenbringt. Auch hier entsteht mit den Extrakten aus TyS nur ein spärlicher, lockerer Niederschlag, mit den Extrakten aus TyB eine massige, voluminöse Fällung.

## II.

Um nun auch für die näheren Details unserer oben geschilderten Absorptionsversuche eine Erklärung zu finden, wollen wir in der Weise vorgehen, daß wir zunächst rein theoretisch erwägen, was wir für Befunde auf Grund unserer Kenntnisse von den Absorptionsverhältnissen zu erwarten haben dürften, und daß wir dann untersuchen, ob diese Deduktionen mit den tatsächlichen Befunden übereinstimmen oder nicht.

Aus dieser Uebereinstimmung oder Nichtübereinstimmung können wir dann entnehmen, ob die Prinzipien und Voraussetzungen, auf denen wir unsere Deduktionen aufgebaut haben, richtig bzw. zur Erklärung ausreichend waren. Zwar ist dieser von uns eingeschlagene Weg, zu einer Deutung der beobachteten Phänomene zu gelangen, vielleicht nicht der gewöhnliche; es scheint mir aber in diesem Falle leichter zum Ziele zu führen, als es die einfache Interpretation der fertigen Versuchsergebnisse sein würde.

1) Wir wollen zunächst die einfachste mögliche Annahme machen und sehen, ob dieselbe zur Erklärung unserer Be-

1) Bassenge, Berlin. klin. Wochenschr., 1908.

obachtungen ausreicht. Diese Annahme würde darin bestehen, daß erstens die Einheitlichkeit des Agglutinins im Serum vorausgesetzt würde, zweitens aber angenommen würde, daß sich die TyS-Bakterien nur durch ihre geringere Avidität zu dem Agglutinin von den TyB-Bakterien unterscheiden, wobei der Ausdruck Avidität vorläufig nur in dem Sinne von Bindungsfähigkeit gebraucht sein soll. Selbstverständlich wissen wir, daß diese erstere Annahme, streng genommen, nicht richtig sein kann, da ja die Existenz verschiedener Partialagglutinine und verschieden aviden Agglutininfraktionen durch meine eigenen früheren Arbeiten zweifellos sichergestellt ist. Es wäre aber immerhin denkbar, daß diese komplexe Zusammensetzung der wirksamen Serumsubstanzen bei unseren Versuchen weiter keine Rolle gespielt hätte und daß sich die beobachteten Absorptionsverhältnisse auch schon unter der oben gemachten einfacheren Voraussetzung erklären ließen, indem die sämtlichen Agglutinin- und Rezeptorentypen, die hierbei in Betracht kämen, jeder für sich bei den Absorptionsversuchen das gleiche Verhalten zeigen könnte, so daß also auch das Gesamtergebn im Wesen dasselbe wäre, wie wenn wirklich nur ein einheitliches Agglutinin und ein einheitliches, aber in seiner Avidität bei TyS und TyB differentes Agglutininogen vorhanden wäre.

Betrachten wir nun zunächst die Absorptionsquotienten, die sich bei Versuch I und II bei dem konzentrierten (unverdünnten) und in Versuch III bei dem 10-fach verdünnten Typhusserum ergeben hatten, und die ich in der folgenden kleinen Tabelle nochmals zusammenstelle.

Versuch	Absorption TyS .		Absorption TyB	
	gegen TyB	gegen TyS	gegen TyB	gegen TyS
I	0,96	0,36	0,96	0,68
II	0,82	0,36	0,95	0,68
III	0,52	0,36	0,93	0,36

Eine Vergleichung des ersten mit dem dritten und des zweiten mit dem vierten Stabe dieser Tabelle ergibt nun einen, wenn auch nicht immer beträchtlichen, Unterschied zwischen den einander entsprechenden, d. h. mit der gleichen Bakterien-

art ermittelten Absorptionsquotienten, und zwar zuungunsten der Absorption mit TyS.

So ist z. B. der Quotient für TyS bei Absorption mit TyS 0,36, bei Absorption mit TyB 0,68 usw.

Diese Tatsache ist uns bereits bekannt und eben nur der Ausdruck dafür, daß TyS weniger Agglutinin aus dem Serum zu absorbieren vermag als TyB, also geringere Avidität besitzt.

Vergleicht man nun aber weiterhin Stab 1 mit Stab 2 und Stab 3 mit Stab 4, also jene Quotienten, die sich bei dem Absorptionsversuch mit derselben Bakterienvarietät ergaben, so zeigen sich hier noch beträchtlichere Differenzen.

Während z. B. bei der Absorption mit TyS die für TyB ermittelten Quotienten 0,96 bzw. 0,82 betrugen, waren die für TyS geltenden 0,36.

Wie ist dies nun von dem Standpunkt unserer oben gemachten Annahme aus zu erklären? Nach derselben ist im Serum ein einheitliches Agglutinin vorhanden, das auf die TyS- und TyB-Bakterien mit ungleicher Avidität einwirkt, von den ersteren weniger reichlich gebunden wird als von den letzteren und die TyS-Bakterien nicht in denselben hohen Verdünnungen agglutiniert wie die TyB-Bakterien.

Setzt man nun diesem Serum zum Zwecke des Absorptionsversuches eine Bakterienemulsion zu, so wird dieselbe, je nach der verwendeten Varietät, mehr oder weniger von dem einheitlichen Agglutinin absorbieren. Der Endeffekt dieses Versuches wird demnach der gleiche sein können, wie wenn der Agglutiningehalt des Serums durch verschieden starke Verdünnung herabgesetzt worden wäre. Daß hierdurch aber die eben erwähnten Differenzen in den Absorptionsquotienten keine Erklärung finden, ist leicht einzusehen.

Denn, sei die Wirksamkeit unseres Agglutinins auf TyS gleich  $a$ , auf TyB  $m$ -mal so groß, als gleich  $ma$ ; sei ferner durch die Absorption, etwa mit TyS, der Agglutiningehalt des Serums auf  $\frac{1}{n}$  herabgesetzt, seine Wirksamkeit auf TyS somit nunmehr  $\frac{a}{n}$ , so wäre seine Wirkung auf TyB natürlich  $\frac{ma}{n}$ ;

der Absorptionsquotient für TyS wäre somit  $\frac{a - \frac{a}{n}}{a} = \frac{na - 1}{na}$

und der für TyB ebenfalls:  $\frac{ma - \frac{ma}{n}}{ma} = \frac{na - 1}{na}$ . Aus dieser

einfachen Ueberlegung geht also hervor, daß unsere tatsächlichen Beobachtungen nicht der gemachten Voraussetzung entsprechen, und daß wir uns daher nach einer anderen Erklärung für unsere Befunde umsehen müssen.

2) Als zweite Grundannahme, unter der wir die Erklärung unserer Versuchsergebnisse versuchen wollen, sei folgendes aufgestellt: TyS- und TyB-Bakterien sollen sich wieder nur durch ihre verschiedene Avidität zu dem Agglutinin voneinander unterscheiden, gleichzeitig nehmen wir aber — im Einklang mit unseren früheren Untersuchungen<sup>1)</sup> — an, daß im Serum Agglutinine verschiedener Avidität vorhanden seien. Abgesehen von diesen Aviditätsdifferenzen seien die Agglutinine aber insofern als einheitlich gedacht, als wir voraussetzen wollen, daß besondere Partialagglutinine für TyB und TyS nicht existieren.

Setze ich nun TyS-Bakterien zu dem Serum hinzu, so müssen sich dieselben vor allem mit den avidesten Agglutininen beladen; ebenso natürlich auch die TyB-Bakterien; da jedoch die Avidität von TyB größer ist als die von TyS, so werden die letzteren mehr Agglutinine von niederer Avidität binden als die ersteren. Der Effekt wird also der sein, daß bei der Absorption mit TyS avidere Agglutinine im Serum zurückbleiben werden als bei der Absorption mit TyB.

Um nun aber die Absorptionsverhältnisse von diesem Standpunkt aus betrachten zu können, bedürfen wir noch einer weiteren Annahme, und zwar darüber, wie sich die Wirksamkeit der aviden und weniger aviden Agglutinine beiden Bacillenvarietäten gegenüber verhält. Diesbezüglich wollen wir nun vorläufig die Annahme machen, daß *ceteris paribus*, d. h. bei gleicher Wirksamkeit auf TyS — die avideren Agglutinine den Stamm TyB stärker beeinflussen als die Agglutinine geringer Avidität. Mit an-

1) Arch. f. Hygiene, 1908.

deren Worten, das Verhältnis der Titerzahlen  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  wird nach dieser Annahme bei den hochaviden Agglutininen viel größer sein als bei den weniger aviden Fraktionen. Die Gründe, weshalb wir gerade diese Annahme machen, werden wir im folgenden sofort kennen lernen.

Sind nun, vor der Absorption, in dem Serum averse und wenig averse Agglutinine nebeneinander vorhanden, so wird sich dementsprechend eine gewisse Verhältniszahl für die Wirksamkeit auf TyB und TyS ergeben (bei unseren Versuchen I und II betrug diese Verhältniszahl  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  z. B. 60). Bleiben dann, nach erfolgter Absorption, die wenig aviden Fraktionen der Agglutinine in relativ größerer Menge zurück als die hochaviden, so werden die ersteren bei ihrem Einfluß auf den Wert der Verhältniszahl  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  überwiegen; da nun dieser Quotient, wie wir oben angenommen haben, für die wenig aviden Agglutinine viel kleiner ist als für die aviden, so folgt weiter, daß derselbe durch die Absorption gedrückt werden muß.

Wenn wir zunächst nur die Absorptionsversuche mit Vollserum und mit 10-fachen Verdünnungen desselben berücksichtigen, so trifft diese Schlußfolgerung nun tatsächlich zu.

Folgende kleine Tabelle läßt dies sehr deutlich erkennen.

Verhältnis  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  für die zurückbleibenden Agglutinine  
(vor Absorption bei Versuch I und II: 60, bei Versuch III: 20).

Versuch	Verdünnung	Absorption mit TyS	Absorption mit TyB
I	0	4	8
	10	20	2
II	0	16	8
	10	40	2
III	0	15	8
	10	15	2

Denn die Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  sind von dem ursprünglichen Wert (60) in einzelnen Fällen bis auf 2 heruntersgesetzt.

Nur das Widerspiel dieser Beobachtung stellt es dar, wenn im Gegensatz hierzu die Verhältniszahlen  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  für die absorbierten Agglutinine relativ hohe sind, wie folgende Tabelle zeigt.

Verhältnis  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  für die absorbierten Agglutinine.

Versuch	Verdünnung	I. Absorption mit TyS	II. Absorption mit TyB
I	0	159	84
	10	73	68
II	0	138	84
	10	63	79
III	0	40	68
	10	28	52

Die absorbierten Agglutinine sind ja eben diejenigen, welche die größere Avidität besaßen, und die daher nach unserer Auffassung auch einen hohen Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  aufzuweisen hatten.

Betrachtet man nun die Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  für die zurückbleibenden Agglutinine etwas genauer, so fällt sofort auf, daß deren Herabsetzung eine viel beträchtlichere ist, wenn die Absorption mit TyB vollzogen wurde, als wenn dieselbe mit dem Stamme TyS ausgeführt wurde. Auch dies ist nach dem Vorigen leicht begreiflich. Denn da die Absorption mit TyB infolge der größeren Avidität dieses Bakterienstammes eine vollständigere ist, als die Absorption mit TyS, so bleiben hier nur die am wenigsten aviden Agglutininfraktionen im Serum zurück, die auch die niedrigsten Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  besitzen.

Bei der weniger vollständigen Absorption mit TyS dagegen werden auch Agglutinine höherer Avidität im Serum zurückgelassen, die durch ihren höheren Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  auch den Gesamtquotienten des Serums vergrößern.



Hieraus ergibt sich aber auch das Verhalten der Absorptionsquotienten, die ja nur eine andere Darstellungsweise derselben Bindungsverhältnisse bedeuten. Denn sei TyB und TyS der Titer des Serums vor der (mit einem beliebigen der beiden Stämme ausgeführten) Absorption, TyB<sub>1</sub> und TyS<sub>1</sub> der Titer nach der Absorption, so sind die Absorptionsquotienten bzw. für den Bouillon- und den Serumstamm:

$$\frac{\text{TyB} - \text{TyB}_1}{\text{TyB}} \text{ und } \frac{\text{TyS} - \text{TyS}_1}{\text{TyS}} \text{ oder} \\ 1 - \frac{\text{TyB}_1}{\text{TyB}} \text{ und } 1 - \frac{\text{TyS}_1}{\text{TyS}}.$$

Da nun nach obigem TyB > TyS, so kann man auch schreiben:

$$\text{TyB} = n\text{TyS} \text{ (wo } n > 1 \text{ und ebenso } m > 1),$$

ferner ebenso: TyB<sub>1</sub> = mTyS<sub>1</sub>,

somit werden die Quotienten

$$\text{für TyB: } 1 - \frac{m\text{TyS}_1}{n\text{TyS}}$$

$$\text{für TyS: } 1 - \frac{\text{TyS}_1}{\text{TyS}}.$$

Nun ist aber infolge der Absorption, wie wir bereits wissen,

der Quotient  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  herabgesetzt, also

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} > \frac{\text{TyB}_1}{\text{TyS}_1} \text{ oder}$$

$$n > m, \text{ somit } \frac{m}{n} \text{ kleiner als } 1;$$

daraus folgt aber, daß  $1 - \frac{m}{n} \cdot \frac{\text{TyS}_1}{\text{TS}}$  größer als  $1 - \frac{\text{TyS}_1}{\text{TS}}$  sein muß.

Mit anderen Worten: die Absorptionsquotienten, für den Stamm TyS ermittelt, müssen kleiner sein als für den Stamm TyB, gleichgültig mit welchem Stamm die Absorption ausgeführt wurde. Das war aber die Tatsache, die wir aus unseren Versuchen abgeleitet hatten.

Wir sehen somit, daß tatsächlich die beiden gemachten Voraussetzungen — die ja übrigens nichts Hypothetisches an sich haben, sondern experimentell gut fundiert sind — nämlich verschiedene Avidität der Serumagglutinine

und verschiedene Bindungsfähigkeit der TyB- und TyS-Bakterien, zur Erklärung der beobachteten Absorptionsverhältnisse hinreichen<sup>1)</sup>).

Nur die dritte der gemachten Voraussetzungen, die sich auf die Beziehungen zwischen der Avidität der Agglutinine und ihrer Wirksamkeit auf TyB und TyS erstreckt, bedarf noch näherer Besprechung.

Wir hatten gesehen, daß das Verhältnis  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  bei den absorbierten, also avidesten Agglutininen sehr hoch, bei den zurückbleibenden, also wenig aviden Agglutininen dagegen sehr niedrig war, und hatten daraus — allerdings in durchaus hypothetischer Form — auf eine Beziehung zwischen diesen beiden Größen geschlossen, die ja für den untersuchten Spezialfall zutreffend war, von der es aber zweifelhaft sein mußte, ob ihr allgemeinere Bedeutung zukomme.

Dies festzustellen, mußte die Aufgabe besonderer Versuche sein.

### III.

Zunächst suchte ich nun zu ermitteln, ob die Herabsetzung der Quotiententiter  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$ , die wir bei der Absorption eintreten sahen, auch bei anderen Immunseren zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurden eine Reihe von Kaninchen mit dem Stamm TyB fortlaufend immunisiert und von Zeit zu Zeit ein Absorptionsversuch mit TyB mit Bestimmung der Titerwerte<sup>2)</sup> gegen beide Bakterienstämme ausgeführt. Die Resultate finden sich in folgender kleinen Tabelle verzeichnet.

1) Es mag hier erwähnt werden, daß Friedberger und Moreschi (Berl. klin. Wochenschr., 1905) bei ihren Studien über den schwer agglutinierbaren Typhusstamm „Sprung“ zu Absorptionsergebnissen gelangt sind, die in mancher Beziehung an die oben geschilderten erinnern. Zur Erklärung derselben nehmen die Forscher an, „daß die von verschiedenen Rassen des Typhusbacillus gebildeten Antikörper unter sich in höchstem Maße verschieden sind“.

2) Die Titerbestimmung wurde hier insofern anders ausgeführt als früher, als die Verdünnungen nicht nach steigenden Potenzen von 2 angelegt wurden, sondern von ein und derselben Serumverdünnung 1,0, 0,9, 0,8 . . . . 0,3, 0,25, 0,2 ccm in Verwendung kamen, also eine größere Zahl von Zwischenstufen eingeschaltet wurde.

Kaninchen	Datum	$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$	$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$	Anmerkung
		vor Absorpt.	nach Absorpt.	
b	22. III.	31,2	32,0	Bei dem Absorptionsversuch wurden gleiche Volumina Serum und Bakterienaufschwemmung gemischt
A	27. III.	20,8	12,0	
B	27. III.	13,9	6,0	
C	28. III.	18,7	10,0	
D	28. III.	16,5	10,0	
a	29. III.	41,6	35,5	
b	22. IV.	50,0	16,6	Absorption mit TyS
C	28. IV.	8,0	2,0	
B	30. IV.	7,5	1,0	
B	30. IV.	7,5	3,0	
B	6. V.	2,1	1,2	
C	7. V.	6,6	2,0	

Wie man dieser Tabelle entnehmen kann, zeigte sich — von einem Versuch abgesehen, wo der Titer unverändert geblieben war — überall in mehr oder minder ausgesprochener Weise das erwähnte Phänomen des Absinkens der Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  infolge der Absorption, so daß wir diesem Phänomen also eine allgemeinere Gültigkeit zuschreiben können.

Daß gelegentlich die Absenkung des Quotienten ausbleibt, widerspricht dem durchaus nicht, und ist wohl nur durch die — auch anderweitig von mir beobachtete — Tatsache zu erklären, daß manche Sera nur solche Agglutinine enthalten, die sich in ihrer Avidität sehr wenig voneinander unterscheiden. Nach erfolgter Absorption bleiben in solchem Falle dann Agglutinine zurück, die nicht merklich geringere Aviditäten aufweisen, als die vor der Absorption in dem Serum enthaltenen; daher werden dann auch die Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  hier keine wesentliche Veränderung erkennen lassen.

Auf Grund dieser Tatsachen werden wir also annehmen dürfen, daß auch bei unseren Kaninchenserum die avideren Agglutininfraktionen durch einen höheren Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  ausgezeichnet sind, als die weniger aviden, wie wir das für unsere Experimente

an Pferdeimmunserum in einem früheren Abschnitt auseinandergesetzt hatten.

Ich habe übrigens noch auf anderem Wege versucht, die Beziehungen zwischen der Avidität und der Größe der Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  sicherzustellen, und zwar mit Hilfe des Abspaltungsversuches. Bringt man Bacillen mit dem Immunserum zusammen, zentrifugiert dieselben nach erfolgter Absorption ab, wäscht sie mit Kochsalzlösung gründlich aus, schwemmt sie dann in einer kleinen Flüssigkeitsmenge auf und erwärmt dieselbe  $\frac{1}{4}$  Stunde auf  $60^{\circ}$ , so wird ein Teil der absorbierten Agglutinine wieder abgespalten. Da natürlich besonders die avidesten Agglutininfraktionen absorbiert worden sind, so wird die Avidität dieser abgespaltenen Agglutinine durchschnittlich höher sein, als die der Agglutinine des Ausgangserums. Dann muß aber — wenn die supponierte Beziehung zwischen der Avidität und den Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  tatsächlich zu Recht besteht — dieser Quotient für die abgespaltenen Agglutinine einen höheren Wert besitzen als für das ursprüngliche Immunserum.

Die nachstehenden Versuchsprotokolle berichten über diese Experimente.

#### Versuch. I.

4. V. 1909. Serum von Kan. A (mit TyS injiziert).

vor Absorption

Titer TyB: 7143

„ TyS: 7143

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 1,0$$

nach Absorption (10 Serum + 10 Bac.)

Titer TyB: 3333

„ TyS: 3333

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 1,0$$

Der abzentrifugierte Niederschlag 5mal mit 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung gewaschen; in 6 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt,  $\frac{1}{4}$  auf  $60^{\circ}$  erhitzt, dann von den Bacillen abzentrifugiert.

Abgespaltene AE (in 1 ccm Flüssigkeit):

für TyB: 66,6

„ TyS: 28,5

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 2,4$$

Das absorbierte Serum wird ein zweites Mal mit dem gleichen Volumen Typhus B zusammengebracht; wie oben verfahren.

Abgespaltene AE:

für TyB: 57,0

„ TyS: 33,3

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 1,7$$

Versuch II.

6. V. 1909. Kan. B.

Titer TyB: 6250

„ TyS: 2857

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 2,1$$

nach Absorption: Titer TyB: 2000

„ TyS: 1666

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 1,2$$

Abspaltungsversuch wie bei I.

Abgespaltene AE (in 1 cem Flüssigkeit):

Titer TyB: 250

„ TyS: 30

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 8,3$$

Versuch III.

7. V. 1909. Kan. C.

Titer TyB: 1111

„ TyS: 1666

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 6,6$$

nach Absorption: Titer TyB: 4000

„ TyS: 2000

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 2,0$$

Abspaltungsversuch wie bei I.

Abgespaltene AE (in 1 cem Flüssigkeit):

Titer TyB: 80

„ TyS: 10

$$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}} = 8,0$$

Wie man sieht, haben die Beobachtungen tatsächlich der Erwartung vollkommen entsprochen. Aus der folgenden kleinen Uebersichtstabelle ist sehr deutlich zu erkennen, wie die abgespaltenen Agglutinine sämtlich einen höheren Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  aufweisen, als das Serum vor und besonders nach der Absorption.

Uebersichtstabelle.

Versuch	$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$ vor Absorption	$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$ nach Absorption	$\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$ nach Abspaltung
I	1,0	1,0	2,3
II	2,1	1,2	8,3
III	6,6	2,0	8,0
Mittel:	3,2	1,4	6,2

Auch hier erweisen sich also die avideren, abgespaltenen Agglutinine als diejenigen, welche einen höheren Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  besitzen, so daß wir diese Tatsache nunmehr als sicher gestellt ansehen können. Freilich gilt dieselbe zunächst nur für die verschieden aviden Fraktionen eines und desselben Serums. Ob sie auch insofern Gültigkeit beanspruchen kann, daß beim Vergleiche zweier Sera dasjenige, welchem die höheren Aviditäten zukommen, auch durch die höheren Quotienten ausgezeichnet ist, mag einstweilen noch dahingestellt bleiben. Sollte dies der Fall sein, so wird man aber jedenfalls auch hier mit ähnlichen Verhältnissen und individuellen Verschiedenheiten zu rechnen haben, wie wir sie in der Einleitung unserer Reihe von Arbeiten für die Beziehungen zwischen Avidität und Wertigkeit besprochen haben.

Es bleibt nun noch die Frage zu erörtern, welche Bedeutung wir denn dieser Tatsache zuzumessen haben und welcher Art denn diese von uns aufgefundene Beziehung zwischen der Avidität der Agglutininfraktionen und Höhe der Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  sein dürfte. Vielleicht gelingt es, die eben aufgeworfene, gewiß sehr berechtigte Frage auf Grund der folgenden Ueberlegung zu beantworten, die ich jedoch mit aller Reserve angestellt wissen möchte, und deren Beweiskraft ich — solange nicht ein umfänglicheres Beobachtungsmaterial vorliegt — nicht allzu hoch anzuschlagen geneigt bin.

Wie wir aus den Arbeiten von Landsteiner und seinen Mitarbeitern wissen, nimmt im Verlaufe der Immunisierung

nicht nur die Avidität, sondern vor allem auch die Spezifität der Antikörper zu; d. h. sie werden immer weniger befähigt, auf verwandte, aber etwas abweichend konstituierte Antigene zu reagieren. Es liegt daher sehr nahe, den Schluß zu ziehen, daß avidere Antikörper im allgemeinen spezifischer sind, als die wenig aviden Immunprodukte.

Machen wir die Nutzenanwendung davon auf unseren vorliegenden Fall, so werden wir also annehmen dürfen, daß die im Serum vorhandenen höchstviden Agglutininfraktionen spezifischer auf ihre Antigene — d. h. auf die TyB-Rezeptoren — eingestellt sein werden, als die weniger aviden Agglutinine. Da nun die Rezeptoren der TyB-Bakterien zweifellos im Verlauf der Züchtung auf Immunserum irgendwie verändert worden sind, sei es auch nur in dem Sinne einer geänderten „Zustandsspezifität“ nach Paltauf, so würde daraus folgen, daß die hochviden Agglutinine weniger geeignet sein müßten, mit den Rezeptoren von TyS zu reagieren, als die weniger aviden.

Dies müßte sich aber darin äußern, daß die hochviden Agglutinine zwar TyB bis zu hohen Verdünnungen zu agglutinieren imstande wären, hingegen TyS nur relativ wenig zu beeinflussen vermöchten, während die wenig aviden eine relativ viel höhere Einwirkung auf die TyS-Bakterien erkennen ließen. Dann müßte aber für die hochviden Fraktionen der Quotient  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  sehr groß, für die weniger aviden Agglutinine dagegen relativ niedrig sein. Wie wir sehen, kommen wir also auf diesem Wege zu genau der gleichen Annahme, wie wir sie früher, in einem anderen Abschnitt dieser Arbeit, zu machen genötigt waren; und alle weiteren Konsequenzen, die wir dort aus dieser Voraussetzung gezogen haben, bleiben daher die gleichen. Der Fortschritt dieser Auffassung gegenüber der früheren würde aber darin bestehen, daß wir nun eine gewisse biologische Grundlage für jene Annahme gefunden hätten, welche wir dort lediglich zu dem Zwecke gemacht hatten, eine Uebersicht über die beobachteten Tatsachen zu gewinnen.

### Zusammenfassung.

1) Die von mir bereits vor längerer Zeit gefundene Tatsache, daß Typhusbacillen, die auf spezifischem Immunserum fortgezüchtet werden, eine verminderte Bindungsfähigkeit für Agglutinine besitzen, konnte neuerdings bestätigt werden.

2) Diese verminderte Bindungsfähigkeit kommt auch dadurch zum Ausdruck, daß die Niederschlagsmenge, welche beim Vermischen von TyS-Bakterien mit Immunserum entsteht, eine weit geringere ist, als die bei Verwendung von normalen TyB-Bakterien gebildete.

3) Die TyS-Bakterien absorbieren nicht nur weniger Agglutinineinheiten für TyS, sondern auch für TyB, als die TyB-Bakterien. Es vermögen jedoch beide Stämme immerhin noch beträchtliche Agglutininmengen, und zwar sowohl für TyS wie für TyB, zu binden.

4) Bei Absorption mit einer der beiden Typhusrassen — gleichgültig mit welcher — wird von den Agglutinineinheiten für TyB relativ mehr absorbiert, als von den Agglutinineinheiten für TyS.

5) Aus 1—3 folgt, daß die Absorptionsquotienten, die sich bei der Absorption mit TyB ergeben, höher sind, als die entsprechenden Quotienten, die man bei Absorption mit TyS erhält.

6) Aus 4 folgt, daß die Absorptionsquotienten, die man bei einem Versuch mit beliebiger Bakterienrasse erhält, kleiner sind, wenn man die Titration vor und nach der Absorption mit TyS ausführt, als wenn man dazu TyB-Bakterien benutzt.

7) Weiter folgt aus 4, daß die Quotienten der Titer für TyB und TyS, also  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$ , nach der Absorption kleiner sein müssen als vorher, da ja der Zähler hierbei relativ stärker abnimmt als der Nenner.

8) Die Absorptionsverhältnisse, die sich beim Zusammenbringen der beiden Bacillenrassen (TyB und TyS) mit spezifischem Immunserum ergeben, lassen sich durch die verschiedene Avidität der im Serum enthaltenen Agglutinine und durch die verschiedene Bindungsfähigkeit der beiden Bakterienrassen befriedigend erklären.



9) Nur die eine Annahme ist hierzu noch erforderlich, daß nämlich die Titerquotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  für die Agglutininfraktionen von hoher Avidität größer sind als für die wenig aviden Agglutinine. Die Absorptionsversuche scheinen diese Annahme zu bestätigen.

10) Ebenso haben die Abspaltungsversuche ergeben, daß die von den Bakterien absorbierten — also avideren — Agglutininfraktionen einen höheren Quotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  aufweisen, als das Gemisch der Agglutinine vor der Absorption.

11) Diese Beziehung zwischen Avidität der Agglutininfraktionen und Höhe der Titerquotienten  $\frac{\text{TyB}}{\text{TyS}}$  läßt sich vielleicht mit der Tatsache in Zusammenhang bringen, daß Antikörper höherer Avidität auch größere Spezifität ihrer Wirkung besitzen.

*Nachdruck verboten.*

### **Ueber nekrotisierende Wirkung normaler Sera, speziell des Rinderserums <sup>1)</sup>.**

Von

Prof. Dr. Uhlenhuth,	und	Stabsarzt Dr. Haendel,
Geh. Regierungsrat und Direktor		kommandiert zum Kaiserl.
im Kaiserl. Gesundheitsamt		Gesundheitsamt.

(Eingegangen bei der Redaktion am 16. Juli 1909.)

M. H.! Untersuchungen über die Verwertbarkeit des Ueberempfindlichkeitsphänomens in praktischer Hinsicht und die dabei gemachte Beobachtung, daß mitunter eine sichere Beurteilung etwaiger anaphylaktischer Erscheinungen durch die Giftigkeit einzelner Serumarten doch beeinträchtigt und erschwert werden kann, boten die Veranlassung, auch das Studium über die Giftigkeit und die nekrotisierende Wirkung normaler Sera, speziell des Rinderserums, über die zuerst

1) Vortrag, gehalten auf der Freien Vereinigung f. Mikrobiologie zu Wien, 4. Juni 1909 (vorgetragen von Stabsarzt Dr. Haendel).

von Uhlenhuth<sup>1)</sup> bereits 1897 berichtet worden war, erneut wieder aufzunehmen<sup>2)</sup>).

Bekanntlich hatte Uhlenhuth festgestellt, daß frisches normales Rinder-, Schweine-, Hammel- und Menschenserum in verhältnismäßig kleinen Dosen Kaninchen bei intravenöser und auch Meerschweinchen bei intraperitonealer Einspritzung akut zu töten vermag und bei Meerschweinchen bei subkutaner Anwendung ausgedehnte Gewebszerstörungen (Nekrosen) verursacht. Diese Eigenschaften besitzen Pferde- und Eselserum nicht.

Die Beobachtungen Uhlenhuths über die nekrotisierende Wirkung des frischen Rinderserums sind später durch die eingehenden Untersuchungen Herrmann Pfeiffers<sup>3)</sup> bestätigt und erweitert worden.

War es schon Uhlenhuth bei seinen Untersuchungen aufgefallen, daß ein gewisser Zusammenhang zwischen nekrotisierender und hämolytischer Wirkung des Rinderserums zu konstatieren war, so glaubte H. Pfeiffer den direkten Beweis erbracht zu haben, daß die durch das Serum erzeugte Nekrose auf das Hämolysin desselben zurückzuführen sei, sonach durch einen komplexen, auf dem Zusammenwirken von hämolytischem Komplement und hämolytischem Ambozeptor beruhenden Vorgang verursacht würde.

Insofern bestand jedoch bei den Untersuchungsergebnissen Pfeiffers gegenüber den von Uhlenhuth erhaltenen Befunden ein Unterschied, als dieser mit inaktiviertem,  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 56—60° gehaltenem Rinderserum niemals Nekrosen erzeugen konnte, während Pfeiffer selbst mit Seris, welche  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden dieser Temperatur ausgesetzt waren und keine hämolytische Wirkung mehr ausübten, noch Nekrosen erhielt.

Pfeiffer glaubte diese Beobachtung durch die Annahme erklären zu können, daß das inaktivierte Rinderserum durch das Komplement des Meerschweinchens im Meerschweinchenkörper wieder aktiviert worden sei.

---

1) Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., Bd. 26, 1897.

2) Eine ausführliche Mitteilung erscheint in den Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt.

3) Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., Bd. 51, 1905.

Es wäre hier die interessante, aber doch auffällige Erscheinung aufgetreten, daß das Meerschweinchenkomplement einen gegen die eigenen Zellelemente gerichteten Ambozeptor des Rinderserums im eigenen Körper komplettiert hätte.

Erschien es so einmal interessant, diese Verhältnisse einer genaueren Prüfung zu unterziehen, so war dies weiterhin auch der Fall bezüglich der von Uhlenhuth und Pfeiffer angegebenen Möglichkeit, gegen die nekroseerzeugenden Stoffe des Rinderserums immunisieren zu können.

Handelte es sich bei dem Immunisierungsprozeß um die Entstehung spezifischer, gegen die Ambozeptoren oder gegen das Komplement gerichteter Antikörper, oder kam etwa auch das Phänomen der Komplementablenkung, eventuell der Komplementablenkung *in vivo*, im lebenden Tiere in Betracht?

Die Annahme, daß eine Immunisierung gegen die nekrotisierenden Stoffe des Rinderserums möglich sei, war durch die damaligen Ergebnisse von Reagenzglasversuchen (Uhlenhuth, Verhandl. d. Gesellsch. Deutscher Naturforscher u. Aerzte, 76. Versamml., Breslau 1904, II, 2, p. 532, und H. Pfeiffer, Zeitschr. f. Hyg. etc., Bd. 51, p. 187) begründet, bei welchen die Sera von mit Rinderserum bzw. Rinderblutkörperchen vorbehandelten Meerschweinchen mit aktivem Rinderserum gemischt längere Zeit bei Zimmertemperatur gehalten waren. Derartig behandeltes Rinderserum hämolysierte nicht mehr und rief auch bei subkutaner Einspritzung keine Nekrose mehr hervor.

Nach unserem heutigen Wissen war ja der Gedanke naheliegend, daß es sich bei diesen Versuchen weniger um eigentliche Immunisierungsvorgänge, als vielmehr um das Phänomen der Komplementablenkung gehandelt hat. Bei dieser Auffassung ist auch die zunächst sehr befremdliche Angabe Pfeiffers, daß er Meerschweinchen mit Rinderblutkörperchen gegen die nekrotisierenden Stoffe des Rinderserums immunisieren konnte, ohne weiteres verständlich. Es ist aber kaum eine Erklärung zu finden, wie man sich bei dieser Behandlungsart mit Blutkörperchen die Entstehung von gegen die nekrotisierenden Stoffe des Serums gerichteten Immunkörpern vorstellen könnte. Pfeiffer selbst hat eine ausreichende Erklärung für diese Art der Immunisierung nicht gegeben.

Einer weiteren Untersuchung bedurfte ferner die Frage, ob die Giftigkeit des Rinderserums bedingenden Substanzen mit den nekroseerzeugenden zu identifizieren sind, ob das Komplement auch bei der Giftwirkung beteiligt sei.

Von vornherein war diese Annahme ja nicht unwahrscheinlich, findet sich doch in der Literatur verschiedentlich die Angabe, daß das Rinderserum durch  $\frac{1}{2}$ -stündige Erwärmung auf 56—60° also mit dem Komplement auch seine Giftigkeit verliert.

Ferner sind auch von physiologischer Seite, speziell von Landois u. a., die bei Einspritzungen von fremden Seris beobachteten Vergiftungserscheinungen auf hämolytische Prozesse zurückgeführt worden.

Kurz zusammengefaßt, erstreckten sich also die Untersuchungen auf folgende Fragen:

1) Wird die nekrotisierende Wirkung des Rinderserums durch einen komplexen Vorgang, durch ein Zusammenwirken von hämolytischem Komplement und hämolytischem Ambozeptor bedingt?

2) Beruhen die Giftigkeit und die gewebserstörende Wirkung des Rinderserums auf denselben Stoffen?

3) Ist es möglich, gegen diese Stoffe zu immunisieren, oder sind die bisher als Immunitätserscheinungen angesprochenen Beobachtungen durch das Phänomen der Komplementablenkung zu erklären?

Bezüglich des ersten Punktes gelang es nun ohne weiteres nachzuweisen, daß das Komplement an der nekrotisierenden Wirkung beteiligt ist. Alle Maßnahmen, welche das Komplement zerstören oder sonst unwirksam machen, nehmen auch, wie unsere Versuche in eindeutigster Weise zeigten, dem Serum seine nekrotisierende Kraft. Es blieb sich dabei vollständig gleich, ob das Serum durch Behandeln mit Hefe oder durch ein ablenkendes System seines Komplementes beraubt, oder ob es  $\frac{1}{2}$  Stunde auf 60° erhitzt war.

Niemals gelang es mit einem derart komplementfrei gemachten Serum Nekrose zu erzeugen. Eine Aktivierung des Serums in Meerschweinchenkörper durch das Komplement des injizierten Tieres erfolgte in keinem Falle.

Ebensowenig aber war, wie sich zeigte, eine Komplettierung des Rinderserums, eine Restituierung der nekrotisierenden Kraft außerhalb des Tierkörpers durch Meerschweinchenkomplement möglich.

Inaktiviertes Rinderserum und Meerschweinchenkomplement zu gleichen Teilen gemischt und einige Zeit bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank gehalten, bewirkte bei subkutaner Einspritzung bei Meerschweinchen niemals Nekrose, obwohl es die Fähigkeit, Meerschweinchenblutkörperchen im Reagenzglase zu lösen, wiedererlangt hatte. Allerdings war diese durch inaktives Rinderserum und Meerschweinchenkomplement bewirkte Hämolyse nie so stark wie die des frischen Rinderserums. Daß an dem Ausbleiben der Nekrose nicht etwa die Verdünnung des Rinderserums durch das Meerschweinchenkomplement Schuld war, ging daraus hervor, daß frisches, in der gleichen Weise mit inaktiviertem Meerschweinchen-serum verdünntes Rinderserum seine nekrotisierende Kraft bewahrt hatte, während die gewebserstörende Wirkung des mit Kochsalzlösung verdünnten Serums sogar deutlich verstärkt war.

Die Versuche bewiesen sonach in überzeugender Weise, daß bei der gewebserstörenden Wirkung des Rinderserums das Komplement beteiligt war, sie gaben aber zunächst noch keinen Aufschluß darüber, ob es sich um ein etwaiges Zusammenwirken des Komplements mit anderen Stoffen, eventuell mit den hämolytischen Ambozeptoren des Rinderserums, handelte, da ja, wie erwähnt, bei Komplettierung des inaktiven Rinderserums mit Meerschweinchenkomplement zwar Hämolyse, aber keine Nekrose erzeugt werden konnte.

Die weiteren Untersuchungen waren daher zunächst darauf gerichtet, das frische Rinderserum zwar des hämolytischen Ambozeptors, aber nicht des Komplements zu berauben, um mit einem solchen komplementhaltigen, aber von Ambozeptor befreiten Serum Meerschweinchen zu behandeln. Alle in dieser Richtung angestellten Versuche, auch mehrmalige und langdauernde Abbindungsversuche mit Meerschweinchenblutkörperchen bei 0° waren erfolglos. Es gelang nie, eine genügende Menge der Ambozeptoren zu entfernen und ein zwar komplementhaltiges, aber ambozeptorfrees Serum

zur Prüfung zu erhalten. So behandeltes Serum übte immer noch sowohl eine hämolytische wie nekrotisierende Wirkung aus.

Auf einem anderen Wege gelang es aber denn doch noch, den Nachweis der Komplexität der Vorgänge zu erbringen.

Aus den grundlegenden Hämolyseversuchen von Ehrlich und Sachs ist es bekannt, daß aktives Pferdeserum, welches an und für sich so gut wie keine hämolytische Wirkung auf Meerschweinchenblutkörperchen ausübt, mit inaktivem Rinderserum Meerschweinchenblutkörperchen aufzulösen vermag. Es zeigte sich bei unseren entsprechenden Versuchen, daß das mit Pferdeserum reaktivierte Rinderserum ebenso stark hämolytierte wie das frische Rinderserum. Es zeigte sich aber ferner, daß bei dieser Kombination das mit frischem Pferdeserum zu gleichen Teilen gemischte inaktive Rinderserum auch seine gewebserstörende Wirkung, wenn auch in schwächerem Grade, wieder erlangt hatte.

Diese Beobachtung, daß frisches Pferdeserum, welches für sich allein Meerschweinchen unter die Haut eingespritzt, selbst in großen Mengen reaktionslos resorbiert wird, mit dem an und für sich ebenfalls unwirksamen inaktiven Rinderserum zusammen Nekrose hervorruft, beweist unseres Erachtens zur Genüge, daß es sich um komplexe Vorgänge handeln muß und daß außer dem Komplement noch andere Substanzen des Rinderserums an der nekrotisierenden Wirkung beteiligt sind.

Auch hier ist der auffallende Parallelismus zwischen hämolytischer und nekrotisierender Wirkung bemerkenswert und legt ebenfalls den Gedanken nahe, daß beide Vorgänge durch dieselben Ursachen ausgelöst werden.

Wir haben andererseits doch aber auch eine Reihe von Beobachtungen gemacht, welche geeignet sind, gegen eine derartige Auffassung zu sprechen. Auf das widersprechende Verhalten des durch Meerschweinchenkomplement komplettierten inaktiven Rinderserums, insofern als es zwar im Reagenzglase noch Hämolyse, im Tierkörper aber keine Nekrose zu bewirken vermag, ist dabei wohl weniger Gewicht zu legen, da man annehmen kann, daß die geringe hämolytische Wirkung dieser Kombination, welche ja schon im

Reagenzglase auffällt, an und für sich für eine Gewebszerstörung nicht ausreichend ist, und andererseits das Auftreten der Hämolyse im Reagenzglase keinesfalls auch das Eintreten eines solchen Prozesses im Tierkörper gewährleistet.

Wir haben aber auch sonst bei anderen Seris auffallendere Differenzen zwischen der hämolytischen und nekrotisierenden Wirkung beobachten können. So konnten wir feststellen, daß die Sera von ganz jungen Ferkeln im Gegensatz zu den ebenfalls Nekrose erzeugenden Seris alter Schweine in der Regel nicht imstande waren, Nekrose zu machen, während bezüglich der hämolytischen Kraft meist sich so gut wie keine Unterschiede zwischen den Seris alter und junger Tiere feststellen ließen. Ferner sahen wir in zwei Fällen Kaninchensera keine Nekrose machen, obwohl ihre hämolytische Kraft Meer-schweinchenblutkörperchen gegenüber gerade für Kaninchensera auffallend stark war. Auch verschiedene Hühnersera zeigten ein ähnliches Verhalten.

Daß dagegen ein Serum nekrotisiert, aber nicht hämolytisiert hätte, konnten wir nicht feststellen. Jedenfalls können aber mit Rücksicht auf diese immerhin doch recht bemerkenswerten Divergenzen die nekrotisierenden Stoffe nicht ohne weiteres mit dem Hämolsin, dem hämolytischen Komplement und hämolytischen Ambozeptor identifiziert werden. Es erscheint ja auch schon an und für sich nicht sehr wahrscheinlich, daß die so verschiedenen Vorgänge der Hämolyse und der Gewebsauflösung durch ganz dieselben Serumstoffe, durch dasselbe Komplement und denselben Ambozeptor bedingt werden.

Viel näher liegt schon von vornherein die Annahme, daß es sich bei den gegen die Blutkörperchen und bei den gegen die Gewebszellen gerichteten Stoffen des Serums um verschiedene Substanzen handelt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen hatten nun weiter aber auch bereits in gewisser Beziehung darüber Aufschluß gegeben, daß es sich bei den bisher als Immunitätserscheinungen angesprochenen Beobachtungen, wenigstens soweit sie sich auf Bindungsversuche im Reagenzglase beziehen, aller

Wahrscheinlichkeit nach nicht um eigentliche Immunitätsvorgänge, sondern lediglich um Komplementablenkung gehandelt hat.

Andererseits war es aber nicht mit Sicherheit auszuschließen, ob nicht doch auch neben dem Komplementbindungsphänomen mit der Bildung spezifischer Antikörper zu rechnen war. Daß das Phänomen der Komplementablenkung bei dieser Frage zu Irrtümern Anlaß geben kann, geht aus den vorstehenden Ausführungen hervor.

So gelang es denn auch ohne weiteres, die nekrotisierende Wirkung des Rinderserums nicht nur durch Abbindung mit Seris von mit aktivem Rinderserum vorbehandelten Meerschweinchen auszuschalten, sondern auch durch Mischung mit Seris von Tieren, welche mit inaktivem Rinderserum oder mit Pferdeserum vorbehandelt waren. Notwendig war im letzteren Falle nur die Zufügung von Pferdeserum, um das ablenkende System zu vervollständigen. Ebenso gelang es auch mit Pferdeeiweiß präzipitierenden Seris von Kaninchen zusammen mit Pferdeserum dem Rinderserum seine nekrotisierende Wirkung zu nehmen. Natürlich waren diese Versuche nur erfolgreich, wenn das zur Komplementbindung benutzte System stark genug war, um sämtliches Komplement des Rinderserums zu fixieren. Auch hier wurde die Beobachtung gemacht, daß es bei dieser Versuchsanordnung nicht sowohl auf den präzipitierenden Titer des Serums als auf den Gehalt an ablenkenden Stoffen ankam. Ein sehr hochwertiges präzipitierendes Serum fixierte z. B. nur wenig Rinderkomplement, während ein anderes Serum mit schwächerem Titer bei derselben Versuchsanordnung in den gleichen Mengen sämtliches Komplement absorbierte. Im allgemeinen machte es jedoch den Eindruck, als ob die völlige Absorption des nekrotisierenden Komplementes des Rinderserums leichter gelang, wenn Serum der zu behandelnden Tierart, im vorliegenden Falle also Meerschweinchenserum, statt Kaninchen- serum als Antiserum des ablenkenden Systems benutzt wurde.

Die Entscheidung, ob eine Immunisierung möglich sei, konnte also nur durch direkte Prüfung an vorbehandelten Tieren herbeigeführt werden.



Es wurden zu diesem Zwecke eine größere Anzahl von Meerschweinchen auf die verschiedenste Weise, subkutan, intraperitoneal, intrakardial, mit aktivem Rinderserum vorbehandelt. Einige Tiere erhielten ferner inaktives Rinderserum, andere große Mengen von Pferdeserum, um zu sehen, ob nicht durch besonders forcierte Behandlung mit heterologem Serum eventuell doch vielleicht auch ein gewisser Schutz zu erreichen wäre.

Alle diese Immunisierungsversuche haben nun ein vollkommen negatives Ergebnis gehabt. Einerlei ob die Tiere 4—5mal oder noch öfter mit frischem Rinderserum gespritzt waren und Nekrosen überstanden hatten, bei jeder neuen Einspritzung entwickelte sich wieder eine typische Nekrose. Uhlenhuth hatte früher einige Meerschweinchen beobachtet, welche, nachdem sie wiederholt nach Behandlung mit Rinderserum größere Gewebszerstörungen überstanden hatten, keine Nekrose mehr bekamen. Diese Tiere hatten aber infolge der Vorbehandlung narbige Veränderungen, die vielleicht das Auftreten neuer Nekrosen verhinderten und so eine Immunität vortäuschten <sup>1)</sup>.

Unsere jetzigen Versuche sind wohl kaum anders zu deuten, als daß eine wirkliche Immunität gegen die nekrotisierenden Substanzen nicht sicher zu erzielen ist.

Sie zeigen ferner, daß bei der subkutanen Serum-einspritzung eine Komplementablenkung im lebenden Tiere nicht zu stande kommt, ebensowenig wie wir dabei eine Komplettierung des inaktiven Rinderserums durch Meerschweinchenkomplement im Tierkörper beobachten konnten. Die Versuche sprechen daher in gewissem Sinne auch gegen die Möglichkeit, Antikomplemente zu erzeugen, doch möchten wir aus unseren Beobachtungen in dieser Hinsicht keine verallgemeinernden Schlüsse ziehen.

Dagegen möchten wir hier noch kurz einige gelegentlich der verschiedenen Immunisierungsversuche gemachte Beobachtungen erwähnen.

---

1) Ueberhaupt eignen sich zu Nekroseversuchen nur junge Meerschweinchen. Bei älteren Tieren macht sich die Dicke der Haut schon störend bemerkbar.

So sahen wir nach wiederholten subkutanen oder intraperitonealen Einspritzungen die von Uhlenhuth früher beschriebenen charakteristischen Serumexantheme auftreten. Es handelt sich hierbei nicht um eine Erscheinung, welche nur durch Rinderserum ausgelöst wird, sondern auch bei wiederholten Gaben großer Dosen von Pferdeserum hatten wir denselben Effekt. Ebenso sahen wir sowohl bei den mit Pferdeserum wie bei den mit inaktivem Rinderserum vorbehandelten Tieren lokale anaphylaktische Erscheinungen auftreten; die eingespritzten Serummengen wurden bei wiederholter Einspritzung nicht schneller, sondern scheinbar langsamer resorbiert, es kam verschiedentlich auch bei den mit Pferdeserum und inaktivem Rinderserum behandelten Tieren dann zur Bildung harter Infiltrate und in einigen Fällen auch zu kleineren Nekrosen. Diese Nekrosenbildung ist aber lediglich als ein anaphylaktisches Symptom (Arthus) aufzufassen und hat mit der nekrotisierenden Wirkung des Rinderserums nichts zu tun.

Bei den intrakardial behandelten Tieren fiel in einigen Fällen besonders das schnelle Eintreten der Anaphylaxie auf. Wenn die Tiere 3 oder auch erst 2 intrakardiale Einspritzungen erhalten hatten, gingen sie manchmal unter anaphylaktischen Erscheinungen zu Grunde, obwohl die nächste Injektion schon am 3. oder 4. Tage nach der letzten Einspritzung verabfolgt wurde.

Endlich wäre hier noch das Auftreten eines auf Anaphylaxie<sup>1)</sup> beruhenden heftigen lokalen Schmerzes zu

---

1) Es sei an dieser Stelle kurz noch folgende von uns gemachte Beobachtung erwähnt, welche für die theoretische Auffassung der Anaphylaxie (Friedberger, Doerr) wohl von Bedeutung sein dürfte. Während es ohne weiteres möglich ist, Meerschweinchen durch Vorbehandeln mit Pferdeciweiß präzipitierendem Kaninchenserum gegen Pferdeserum passiv anaphylaktisch zu machen, gelingt dies dagegen auch mit hochwertigem Pferdeantiserum vom Huhn nicht. Diese Beobachtung weist auf einen gewissen Zusammenhang mit dem Komplementbindungsphänomen hin, indem in diesem Falle auch bezüglich der Anaphylaxie Verhältnisse vorzuliegen scheinen, wie sie von Moreschi bezüglich der Komplementbindung (Freie Vereinigung für Mikrobiologie 1906) mitgeteilt worden sind.

erwähnen, das nach wiederholten subkutanen Einspritzungen bei vielen Tieren beobachtet wurde, während erstmalig gespritzte Tiere keine erhöhte Schmerzempfindlichkeit erkennen ließen.

Zum Schlusse noch einige Worte über die etwaige Identität der die Giftigkeit und die Nekrose bedingenden Stoffe des Rinderserums.

Schon die ersten Erwärmungsversuche zeigten, daß eine derartige Identität nicht in Frage kam. Im Gegensatz zu einzelnen Angaben in der Literatur ergab sich, daß das  $\frac{1}{2}$  Stunde bei 60° gehaltene frische Rinderserum seine Giftigkeit nicht verloren hatte. Derartig behandeltes Rinderserum vermochte zwar selbst in der Menge von 1,0 ccm keine Spur von Hämolyse mehr zu bewirken, intrakardiale Einspritzungen von  $\frac{1}{2}$  ccm des Serums töteten aber Meerschweinchen akut. Selbst nach einstündiger Erwärmung auf 60° wirkte 1 ccm des Serums bei intrakardialer Einspritzung sofort tödlich. Die Giftigkeit des Serums hat sonach jedenfalls mit dem Komplement nichts zu tun und beruht auf anderen als den nekroseerzeugenden Stoffen. Die giftig wirkenden Substanzen sind zwar ebenfalls labil und werden durch Temperaturen von 56—60° schon geschädigt, sie erweisen sich dagegen aber doch widerstandsfähiger als das Komplement. Umgekehrt nimmt aber beim Stehen nach einigen Tagen die Giftigkeit des Serums schneller ab wie der Komplementgehalt desselben.

Die Tatsache, daß bei der Giftwirkung des Serums das Komplement nicht wesentlich beteiligt zu sein scheint, läßt es nicht ausgeschlossen erscheinen, gegen die Giftstoffe des Serums mit Erfolg immunisieren zu können. Wir haben bezüglich dieses Punktes noch keine eindeutigen Resultate erhalten und sind noch mit weiteren Untersuchungen über diese Frage beschäftigt.

#### Zusammenfassung.

1) Die nekrotisierende Wirkung des Rinderserums beruht auf einem komplexen Vorgang unter Beteiligung des Komplementes.

2) Alle Maßnahmen, welche das Rinderserum seines Komplementes berauben ( $\frac{1}{2}$ -ständiges Erhitzen auf  $56-60^{\circ}$ , Behandeln mit Hefe oder komplementbindenden Systemen), vernichten auch seine nekrotisierende Wirkung.

3) Inaktives, mit Meerschweinchenkomplement komplettiertes Rinderserum vermag zwar im Reagenzglase Meerschweinchenblutkörperchen aufzulösen, erzeugt aber keine Nekrose.

4) Dagegen vermag mit Pferdeserum komplettiertes Rinderserum Nekrose zu erzeugen.

5) Die nekrotisierenden Stoffe sind wahrscheinlich nicht mit dem Hämolsin, hämolytischen Komplement und hämolytischen Ambozeptor identisch.

6) Es gelingt nicht, Meerschweinchen gegen die nekroseerzeugenden Stoffe des Rinderserums zu immunisieren.

7) Die bisher als Immunitätsvorgänge angesprochenen Erscheinungen beruhen auf dem Phänomen der Komplementablenkung.

8) Im Tierkörper findet nach den bisherigen Versuchen (bei subkutaner Einspritzung) keine Ablenkung des nekroseerzeugenden Komplementes statt.

9) Die Nekrose erzeugenden und die die Giftigkeit des Rinderserums bedingenden Stoffe sind nicht identisch.

10) Durch  $\frac{1}{2}$ —1-stündiges Erwärmen auf  $60^{\circ}$  wird die Giftigkeit des Rinderserums für Meerschweinchen zwar beeinträchtigt, aber nicht zerstört.

11) Die Immunisierung gegen die Giftstoffe des Rinderserums erscheint nicht aussichtslos.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Georg-Speyer-Hause zu Frankfurt a. M.;  
Direktor: Geh. Obermedizinalrat Prof. Dr. P. Ehrlich.]

### **Ueber serumfeste Trypanosomenstämme.**

#### **Bemerkungen zu der Arbeit von Levaditi und Mutermilch.**

Von **P. Ehrlich, W. Roehl und R. Gulbransen.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. Juli 1909.)

In einer soeben in dieser Zeitschrift<sup>1)</sup> erschienenen Arbeit von Levaditi und Mutermilch über Antikörperbildung bei Trypanosomenerkrankung und antikörperfeste Trypanosomen kommen diese Autoren zu folgenden Schlußsätzen:

„Il en résulte que, par suite de leur transformation en une variété nouvelle, résistante aux anticorps in vitro et in vivo, les trypanosomes ont perdu la faculté de fixer l'ambocepteur trypanolytique et ont cessé d'être sensible à l'action nocive de cet ambocepteur, sans perdre, pour celà, la faculté de réagir vis à vis des anticorps qui président au phénomène de Bordet et Gengou.“

Der erste Teil dieser Schlußfolgerungen steht durchaus im Einklang mit den Resultaten unserer bereits im September 1907 begonnenen und bisher ununterbrochen fortgeführten eingehenden Untersuchungen, über deren wesentlichste Ergebnisse der eine von uns (E.) schon vor mehr als einem halben Jahre berichtet hat<sup>2)</sup>. Die entsprechende Stelle lautet:

„Nun galt es, einen Einblick zu erhalten in das Wesen dieses Vorganges. Die Erklärung hierfür, die wir nach viel-

1) Bd. 2, p. 702.

2) Ehrlich, Nobelvortrag, gehalten am 11. Dez. 1908 zu Stockholm, und Münchener med. Wochenschr. vom 2. Febr. 1909, No. 5.

fach variierten Experimenten gewonnen haben, ist folgende: In dem Ausgangsstamm ist eine bestimmte einheitliche Art von Nutrizeptoren, die wir als Gruppe „A“ bezeichnen wollen, in reichem Maße vorhanden. Werden nun die Parasiten innerhalb des Mäuseorganismus abgetötet und aufgelöst, so wirkt die Gruppierung „A“ als Antigen und erzeugt nun einen Antikörper, der seiner Entstehung nach Verwandtschaft zur Gruppe „A“ besitzt. Wenn man nun lebende Parasiten, sei es im Reagenzglas, sei es in vivo, mit diesem Antikörper in Berührung bringt, so wird derselbe von den Trypanosomen verankert. Unter dem Einfluß dieser Besetzung erleiden in vivo die Parasiten diejenige biologische Abänderung, die zu dem Rezidivstamm überführt. Diese Abänderung geschieht in der Weise, daß in dem neuen Stamm die ursprüngliche Gruppierung „A“ verschwindet und dafür eine neue Gruppierung, die als „B“ bezeichnet werden möge, auftritt. Daß in dem Rezidivstamm eine neue Gruppierung vorhanden ist, ist in folgender Weise ersichtlich: infiziert man zwei Mäuse mit dem Rezidivstamm, Träger der Gruppierung „B“, heilt sie komplett und infiziert die eine Maus mit dem Ausgangsstamm, die andere mit dem Rezidivstamm selbst, so geht die Nachimpfung mit dem Ausgangsstamm, Träger der Gruppierung „A“, glatt an, während die Nachinfektion mit dem Rezidivstamm zunächst versagt. Es geht daraus hervor, daß Ausgangsstamm und Rezidivstamm dysidentisch sind oder zwei verschiedenen funktionierende Gruppen besitzen müssen. Wir haben hier also einen typischen Fall immunisatorisch erzeugten Rezeptorenschwundes unter Bildung einer ganz neuen Rezeptorenart.“

Es ist also von uns bewiesen worden, daß die Serumfestigkeit antikörperfester Trypanosomenstämme auf einem Rezeptorenschwund unter Bildung einer ganz neuen Rezeptorenart beruht. Wir sind also durch unsere mannigfach variierten Versuche zu viel weitergehenden Schlüssen gelangt als Levaditi und Mutermilch, die für ihre Ansicht, daß die Trypanosomen die Bindungsfähigkeit für den trypanolytischen Ambozeptor verloren haben, keinen strikten Beweis erbracht haben.

Um so auffälliger ist es, daß die Autoren in ihrer Publikation keinerlei Bezug auf unsere Untersuchungen und die daraus gezogenen Schlußfolgerungen nehmen.

Sie künden ferner in der vorliegenden Abhandlung weitere Mitteilungen über die Entstehung der Serumfestigkeit von Trypanosomen mit folgenden Worten an:

„Nous mêmes, dans des expériences qui seront publiées bientôt, avons constaté que ces nouveaux caractères biologiques, transmissibles héréditairement (cf. Mesnil et Brimont) s'acquièrent très rapidement, parfois au bout de quelques minutes de contact *in vitro* avec les anticorps trypanolytiques, et cela avec une assez grande facilité.“

Sie folgen auch hierin unseren Spuren, ohne unsere Untersuchungen zu erwähnen. Denn es steht an der bereits zitierten Stelle:

„Wenn man nun lebende Parasiten, sei es im Reagenzglas<sup>1)</sup>, sei es *in vivo*, mit diesem Antikörper in Berührung bringt, so wird derselbe von den Trypanosomen verankert. Unter dem Einfluß dieser Besetzung erleiden *in vivo* die Parasiten diejenige biologische Abänderung, die zu dem Rezidivstamm überführt.“

Und einige Zeilen vorher:

„Die so erzeugte Abänderung der Parasiten ist nicht oberflächlicher Art, sondern kann durch viele Monate hindurch bei Passagen durch normale Tiere unverändert fortgeführt werden.“

Es ist also bereits von uns mitgeteilt worden, daß die Trypanosomen durch Kontakt *in vitro* eine durch viele Monate andauernde Abänderung erfahren können, und wir wollen hier hinzufügen, daß der Kontakt sich auf 15 Minuten erstreckt hat, und daß solche biologischen Abänderungen der Trypanosomen sich bisher weit über 1 Jahr in mehr als 200 Passagen durch normale Mäuse konstant erhalten haben.

---

1) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

Der Wunsch, das in allgemein biologischer Hinsicht so bedeutungsvolle Verhalten serumfester Trypanosomen nach allen Richtungen zu studieren, hat bisher unsere umfänglichere Publikation über diesen Gegenstand verzögert, wir behalten uns jedoch vor, demnächst ausführlicher unsere Untersuchungen auf dem von uns so eingehend bearbeiteten Gebiete mitzuteilen.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

**Weitere Beiträge zur Frage der Serumanaphylaxie.**

Von Prof. R. Kraus und Dr. R. Volk.

Mit 2 Kurven im Texte.

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. Juni 1909.)

In einer früheren Mitteilung konnte die von Besredka zuerst festgestellte Tatsache, daß das Sensibilinogen thermostabil, dagegen das Antisensibilisin thermolabil sei, bestätigt werden. Wir konnten in Erweiterung der Versuche Besredkas zeigen, daß bei mit erhitztem Serum vorbehandelten Meer-schweinchen, mit erhitztem Serum (intravenöse Injektion) keine Anaphylaxie auszulösen war, wohl aber mit nicht erhitztem. Auch ist es uns gelungen, bei passiv vorbehandelten Meer-schweinchen nur mit nicht erhitztem Anaphylaxie auszulösen, dagegen war erhitztes Serum wirkungslos. Nach unseren Versuchen bestand kein Zweifel darüber, daß durch Erhitzung des Serums (3-fach verdünnt mit Aqu. destill.) über 90° durch 20 Minuten der Körper, welcher bei vorbehandelten Tieren die Anaphylaxie auslöst, zerstört wird, daß aber diesem Serum noch sensibilisierende Eigenschaften zukommen.

Im Gegensatz zu dieser von Besredka und uns vertretenen Auffassung gelangen Doerr und Russ zu der An-

21 \*



nahme, daß die anaphylaktisierende Substanz (Sensibilisinogen) mit jenem Körper identisch sei, der bei der Reinjektion toxisch wirkt und Antianaphylaxie erzeugt (Antisensibilisin Besredkas). Doerr und Russ gelangen zu dieser gegenteiligen Auffassung auf Grund von Versuchen, in welchen sie mit erhitztem Serum Tiere vorbehandelt hatten und eine Abschwächung der Wirkung nachweisen konnten. Sera, die auf 90—120° erhitzt waren, vermochten in Mengen von 0,01 nicht zu sensibilisieren, wogegen 0,001 nicht erhitztes noch sicher zu sensibilisieren vermochte. (Nach Sensibilisierung mit 0,0001 oder 0,00001 gehen die Tiere bei der Probe nicht konstant zu grunde, wie aus dem Protokoll III, auf welches sich die Autoren beziehen, ersichtlich ist.) Auf Grund dieser nachgewiesenen Abschwächung des Sensibilisinogens glauben Doerr und Russ auch eine Abschwächung des Sensibilisins annehmen zu können und glauben, den Ausfall der Versuche von Besredka und unsere durch quantitative Verhältnisse erklären zu können.

Es ist richtig, daß weder Besredka noch wir bei der Reinjektion steigende Serummengen des erhitzten Serums verwendet haben. (In unseren Versuchen wurde stets 1 ccm des 3-fach verdünnten Serums verwendet, also mehr als der einfachen tödlichen Dosis nicht erhitzten Serums entsprochen hat.) Aber schon der Ausfall dieser Versuche, namentlich die nach Reinjektion des erhitzten Serums stets nachgewiesene fehlende Antianaphylaxie spricht gegen die von Doerr und Russ angenommene Abschwächung des Antisensibilisins. Um aber diesem Einwande vollauf gerecht zu werden, haben wir die Versuche fortgesetzt und Serummengen verwendet, die der 10- und mehrfachen tödlichen Dosis nicht erhitzten Serums entsprechen. Diese Versuche wurden an mit Pferde- und Rinderserum vorbehandelten Meerschweinchen und Hunden ausgeführt.

Die Tatsache, daß auf 90° und 100° erhitztes Serum Tiere zu sensibilisieren vermag, was zuerst Besredka nachweisen konnte und wir auch bestätigt fanden, wurde von Doerr und Russ auf Grund von Nachprüfungen ebenfalls

gefunden. Die Autoren fanden gleichzeitig eine Abschwächung der sensibilisierenden Wirkung des erhitzten Serums gegenüber derjenigen des nicht erhitzten. Mit 0,01 auf 90° und 100° erhitzten Serums ist die Sensibilisierung nicht gelungen. In früheren Versuchen haben wir mit 0,1 erhitztem Serum konstant Meerschweinchen überempfindlich gemacht. Die Abschwächung des sensibilisierenden Vermögens, wie sie Doerr und Russ durch Erhitzung gefunden haben, konnten auch wir bestätigen. Die mit 0,005 und 0,01 erhitzten Pferdeserums vorbehandelten Meerschweinchen werden bei der Reinjektion entweder gar nicht krank oder erkranken leicht und erholen sich bald im Gegensatz zu den mit gleichen Mengen nicht erhitzten Serums vorbehandelten Tieren, die stets bei der Reinjektion schwere anaphylaktische Symptome darbieten und zugrunde gehen. 0,05 erhitztes Pferdeserum vermag zu sensibilisieren. Vom erhitzten Rinder Serum haben wir 0,025 und 0,06 zur Sensibilisierung gebraucht. Durch höhere Temperaturen (90°) wird demnach das Sensibilinogen abgeschwächt, jedoch nicht unwirksam gemacht, da man mit 0,05 Serum sicher sensibilisieren kann.

Das derart erhitzte Serum, welches also sicher zu sensibilisieren imstande ist, wirkt bei der Reinjektion gar nicht.

I. Versuche an vorbehandelten Meerschweinchen mit erhitztem, 3-fach verdünntem Pferdeserum (96° durch 20°) und Kontrollversuche mit nicht erhitztem Serum.

Meerschweinchen	Peritoneal injiziert	Intravenöse Reinjektion nach	Nicht erhitztes Serum	Resultat
254	(5,0) 20,0 erhitzt. Ser.	18 Stunden	1,0	sof. Erschg. +
346	(7,5) 30,0	18 "	1,0	" " +
308	(7,5) 30,0 " "	18 "	1,0	" " +
Kontrollen				
164	3,0 nicht erh. Ser.	18 "	1,0	keine Erschg.
914	5,0 " " "	18 "	1,0	" "
302	5,0 " " "	18 "	1,0	" "
536	1,0 " " "	18 "	1,0	" "
381	2,0 " " "	18 "	1,0	" "

II. Versuch an vorbehandelten Meerschweinchen mit erhitztem Pferdeserum (96° durch 20°) und Kontrollversuche mit nicht erhitztem Serum.

Meerschweinchen	Peritoneal injiziert	Intravenöse Reinjektion nach	Nicht erhitztes Serum	Resultat
16	(4,0) 12,0 erhitzt. Ser.	4 Stunden	1,0	sof. Erschg. †
M.	(6,0) 24,0 " "	4 "	1,0	" " †
M.	(6,0) 24,0 " "	4 "	1,0	" " †
Kontrollen				
M.	0,5 nicht erh. Ser.	4 "	1,0	keine Erschg.
"	2,0 " " "	4 "	1,0	" "
"	3,0 " " "	4 "	1,0	" "

III. Versuch an vorbehandelten Meerschweinchen mit erhitztem, 3-fach verdünntem Rinderserum (96° durch 20°) und Kontrollversuche mit nicht erhitztem Serum.

Meerschweinchen	Peritoneal injiziert	Intravenöse Reinjektion nach	Nicht erhitztes Serum	Resultat
71	(1,025) 5,0 erh. Ser.	48 Stunden	1,0	sof. Erschg. †
	(2,5) 10,0 " "	24 "	1,0	" " †
	(2,5) 10,0 " "	24 "	1,0	" " †
160	(5,0) 20,0 " "	6 "	0,5	" " †
197	(5,0) 20,0 " "	6 "	1,0	" " †
170	(5,0) 20,0 " "	6 "	0,5	" " †

Wie aus den Versuchen I—III hervorgeht, haben peritoneale Injektionen des auf 96° durch 20 Minuten erhitzten Pferde- und Rinderserums bei vorbehandelten Meerschweinchen gar keine Wirkung. Dagegen vermag nicht erhitztes Serum schon in Mengen von 1,0 ccm Tiere krank zu machen und innerhalb einer Stunde zu töten. Allerdings ist die Auslösung der Anaphylaxie vom Peritoneum aus nicht konstant; man braucht erstens größere Dosen als bei intravenöser Injektion, und dann, wie gesagt, gelingt es nicht immer, Anaphylaxie zu erzeugen. Das Ausbleiben der anaphylaktischen Erscheinungen nach peritonealer Injektion von

10, 20, 30 erhitzten Serums kann demnach nicht als Beweis für die Zerstörung des Sensibilisins angesehen werden. Wohl aber sind diese Versuche deswegen beweisend, weil die Prüfung auf **Antianaphylaxie** hier entscheidend ist. Vorbehandelte Meerschweinchen, die nach peritonealer Injektion von 0,5, 1, 2, 3, 5 erhitzten Serums am Leben geblieben sind, wurden nach 4, 6, 18 Stunden intravenös mit 1,0 nicht erhitztem Serum reinjiziert und reagierten ausnahmslos mit Erscheinungen der Anaphylaxie, der sie auch nach einigen Minuten erlagen.

Dagegen blieben alle mit nicht erhitztem Serum peritoneal vorinjizierten, sensibilisierten Meerschweinchen am Leben, wenn man sie mit 1,0 nicht erhitztem Serum intravenös nachinjizierte. 0,5 nicht erhitztes vermag bei sensibilisierten Tieren, peritoneal injiziert, die Tiere antianaphylaktisch zu machen, das 10-fache des erhitzten Serums ist es nicht imstande. Hier ist also das Ausbleiben der Antianaphylaxie als Beweis für das Nichtvorhandensein des Sensibilisins im erhitzten Serum anzusehen.

Nachdem die peritoneale Reinjektion zur Auslösung anaphylaktischer Erscheinungen der intravenösen nachsteht und nur die Antianaphylaxie das Fehlen des Sensibilisins im erhitzten Serum anzeigt, haben wir versucht, durch intravenöse Injektion großer Mengen erhitzten Serums bei Meerschweinchen, den direkten Beweis zu erbringen (siehe Versuch IV auf p. 304).

Es gelingt nicht durch intravenöse Injektion von 2—5 ccm erhitzten Serums Anaphylaxie auszulösen. Trotzdem also sicher mehr Serum injiziert wurde, als der 2—5-fachen tödlichen Dosis nicht erhitzten Serums entspricht, zeigten die Meerschweinchen keine Erscheinungen von Anaphylaxie, die sie auf 0,2 nicht erhitzten Serums bekommen. Diese Tiere waren dann auch, wie nicht anders zu erwarten war, nach Reinjektion mit nicht erhitztem Serum typisch anaphylaktisch geworden. Daß wir

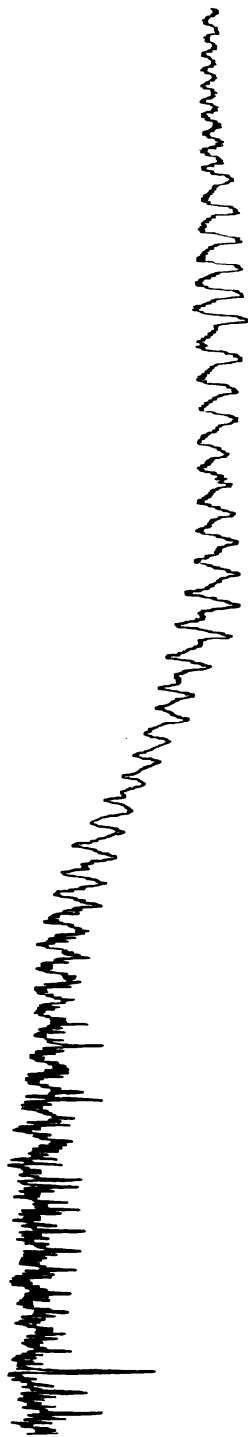
IV. Versuch an vorbehandelten Meerschweinchen mit erhitztem Pferdesera, 3-fach verdünnt 96° durch 20'.

Meerschweinchen	Intravenös erhitzte Sera	Intravenöse Reinjektion nach	Nicht erhitzte Sera	Resultat
372	2,0	1 Stunde	1,0	sofort Erscheinungen, erholt sich
365	5,0	1 „	1,0	keine Erscheinung. <sup>1)</sup>
379	5,0	1 „	1,0	sofort Erscheinung. †
393	5,0	$\frac{3}{4}$ Stunde	1,0	nach 5' Erscheinungen †
274	5,0	$\frac{3}{4}$ „	1,0	sofort Erscheinung. †
376	2,0	$\frac{3}{4}$ „	1,0	„ „ †
371	4,0	$\frac{3}{4}$ „	1,0	„ „ †
223	5,0	$\frac{3}{4}$ „	1,0	„ „ †
254	5,0	sofort Erscheinung † <sup>2)</sup>		
18	10,0	sofort Erscheinung †		
Kontrolle				
377	10,0 erhitztes Rinderserum	sofort Erscheinung †		

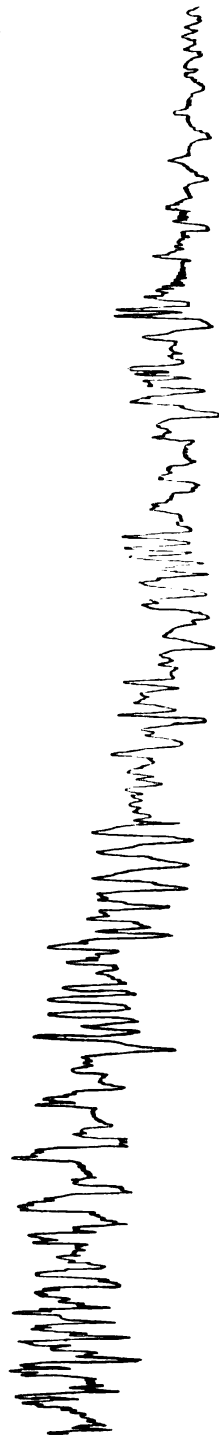
noch größere Serummengen nicht verwendet haben, liegt daran, daß nach intravenöser Injektion von 10 ccm Pferdeserum vorbehandelte Meerschweinchen noch während der Injektion zugrunde gingen. Ebenso gingen aber mit Pferdeserum vorbehandelte Meerschweinchen nach intravenöser Reinjektion von 10 ccm erhitzten Rinderserum zugrunde, so daß diese Versuche nicht fortgesetzt werden konnten. Jedenfalls zeigen diese Versuche, daß das erhitzte Serum nicht imstande ist, auch in größeren Dosen

1) Daß das Meerschweinchen 365 bei der Reinjektion mit nicht erhitztem Serum sich antianaphylaktisch zeigt, ist eine Ausnahme, die in Anbetracht der konstanten positiven Versuche nichts beweist, zumal man auch daran denken kann, daß das Tier überhaupt nicht sensibilisiert war.

2) Auch der Versuch mit Meerschweinchen 254, in welchem 5,0 erhitztes Serum Erscheinungen ausgelöst hat, beweist in Anbetracht der vielen anderen Versuche nichts, zumal auch erhitztes Rinderserum in diesen Mengen mit Pferdeserum vorbehandelte Meerschweinchen tötet. Auch bei vorbehandelten Hunden sehen wir schon auf geringe Dosen erhitzten Serums manchmal Blutdrucksenkung (20, 30 ccm).



Kurve 1.



Kurve 2.

Anaphylaxie auszulösen. Dementsprechend erzeugt es auch keine Antianaphylaxie. Zur Vervollständigung dieser Versuche haben wir noch Versuche an Hunden ausgeführt, die vorher mit Pferde- oder Rinderserum vorbehandelt waren. In diesen Versuchen wurde gleichzeitig der Blutdruck an der Carotis registriert, wie es Biedl und Kraus in ihrer Arbeit beschrieben haben. Die mit Pferdeserum vorbehandelten Hunde (Versuch 1, 2, 4) zeigen auf intravenöse Injektion von 120 und 200 ccm erhitzten Pferdeserums keinerlei Erscheinungen; wird aber nachher nicht erhitztes Pferdeserum injiziert so reagieren sie sofort mit anaphylaktischen Symptomen, Exzitation, Erbrechen, anaphylaktischer Depression, Ungerinnbarkeit des Blutes, Leukopenie und, wie die Kurven demonstrieren, mit typischer anaphylaktischer Blutdrucksenkung. (Kurven 1 und 2.) Genau so verhielten sich die mit Rinderserum vorbehandelten Hunde (Versuch 3 durch 5). Auch hier vermag erhitztes Serum ( $96^{\circ}$  in  $\frac{1}{2}$  Stunde) weder Anaphylaxie, noch Antianaphylaxie zu erzeugen. Die Serummenge, die hier verwendet wurde, entspricht sicher mehr als der 10-fachen tödlichen Dosis nicht erhitzten Serums. Es erscheint somit wohl höchst wahrscheinlich, daß erhitztes Serum die Fähigkeit verliert, bei sensibilisierten Tieren Anaphylaxie auszulösen, im Gegensatz zur sensibilisierenden Eigenschaft, die durch Erhitzung nicht zerstört wird.

1. Versuch. Hund 185 am 19. März 5 ccm Pferdeserum und 5 ccm Rinderserum subkutan.

Am 14. April intravenös 120 ccm auf  $90^{\circ}$  durch 20' erhitztes, 3-fach verdünntes Pferdeserum; keine Änderung des Blutdruckes, auch keine Erscheinungen der Anaphylaxie.

Nach ca. 10' intravenös 10 ccm erhitztes Pferdeserum; sofort Blutdrucksenkung, Exzitation, Erbrechen.

Am 15. April, 10,0 ccm Rinderserum nicht erhitzt; typische Blutdrucksenkung, Anaphylaxie.

2. Versuch. Hund 187 am 19. März 5 ccm Pferdeserum und 5 ccm Rinderserum subkutan.

14. April intravenös 200 ccm 3-fach verdünntes Pferdeserum auf  $95^{\circ}$  durch 20'; keinerlei Erscheinungen.

Nach ca. 10' intravenös 10 ccm nicht erhitztes Pferdeserum; starke vorübergehende Senkung, Erbrechen.

15. April 10 ccm Pferdeserum, nicht erhitzt, intravenös; keinerlei Erscheinungen.

3. Versuch. Hund 85/86 am 26. März Rinderserum.

Am 16. April intravenös 140 ccm 3-fach verdünntes Rinderserum auf 98° durch 20'; keine Erscheinungen.

Nach ca. 15' intravenös 10,0 ccm nicht erhitztes Rinderserum; sofort Senkung, Blut ungerinnbar; die Zählung ergibt Leukopenie.

Am 17. April intravenös 10 ccm Rinderserum; keinerlei Erscheinungen.

4. Versuch. Hund 12 am 17. Mai 5 ccm Pferdeserum und 5 ccm Rinderserum subkutan.

Am 17. Mai intravenös 200 ccm 3-fach verdünntes Pferdeserum auf 98° durch  $\frac{1}{4}$  Stunden; keine Erscheinungen. 19700 weiße Blutkörperchen.

10,0 ccm intravenös nicht erhitztes Serum; Senkung, Exzitation, Anaphylaxie, 6000 weiße Blutkörperchen.

5. Versuch. Hund 25, am 17. April Pferde- und Rinderserum subkutan.

Am 11. Mai intravenös 200 ccm Pferdeserum auf 98° durch  $\frac{1}{4}$  Stunde; keine Erscheinungen.

10,0 nicht erhitztes Pferdeserum; sofort Senkung, Anaphylaxie.

Am 12. Mai intravenös 200 cm Rinderserum auf 96° durch 20'; keine Erscheinungen.

10,0 ccm nicht erhitztes Rinderserum; sofort Blutdrucksenkung, Erbrechen, Anaphylaxie, Blut ungerinnbar<sup>1)</sup>.

### Zusammenfassung.

Durch Erhitzung des Pferde- und Rinderserums über 90° verliert gewöhnlich das Serum die Fähigkeit, bei vorbehandelten Meerschweinchen und Hunden anaphylaktische Er-

1) In einzelnen Fällen hat schon Reinjektion von 20, 30 ccm auf 90° erhitzten Serums anaphylaktische Erscheinungen hervorgerufen. Mit Serum, welches auf 96° durch  $\frac{1}{4}$  Stunde erhitzt wurde, reagieren gesunde Tiere nicht. Ob das Antisensibilisin in einzelnen Seris verschieden thermoresistent ist, oder ob die Sera peptonartige Körper enthalten, die ja das Bild der Anaphylaxie auslösen, ist nicht zu entscheiden.



scheinungen auszulösen. Das derart erhitzte Serum ist noch imstande, Tiere zu sensibilisieren.

Selbst wenn Serummengen verwendet werden, welche Multipla der tödlichen Dosis des nicht erhitzten Serum ausmachen, reagieren vorbehandelte Tiere gar nicht. Vorbehandelte Tiere, die mit erhitztem Serum injiziert sind, werden nach Injektion von nicht erhitztem Serum typisch anaphylaktisch. Erhitztes Serum erzeugt keine Antianaphylaxie, nur nicht erhitztes Serum hat Antianaphylaxie zur Folge,

#### Literatur.

Besredka, Annales de l'Inst. Pasteur, 1908.

Kraus und Volk, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 1, 1909.

Doerr und Russ, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 2, 1909.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Kgl. preuß. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin;  
Direktor: Geh. Obermedizinalrat Dr. Gaffky. Abteilungsvor-  
steher: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. Wassermann.]

**Ueber die Beziehungen von Enzymwirkungen  
zu den Erscheinungen der sogenannten Komplement-  
ablenkung bei Syphilis <sup>1)</sup>.**

Von **Wilfred H. Manwaring, M.D., (U.S.A.).**

Mit 14 Figuren im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. Juli 1909.)

**I. Theoretischer Teil.**

Die von Bordet entdeckte Reaktion zwischen Bakterienemulsionen und dem Blut von mit den betreffenden Mikroorganismen infizierten Tieren bildet die Grundlage für die neueren Entdeckungen auf dem Gebiete der Immunitätschemie. Die Anwendung dieser Entdeckung auf die Syphilis und der Versuch, dieselbe auch auf andere Erkrankungen anzuwenden, hatten reichen Erfolg. Ich habe nun den Versuch unternommen, die verschiedenen auf Grund der ursprünglichen Bordetschen Entdeckung beobachteten Erscheinungen auf eine quantitative Grundlage zu bringen. Nur durch solches quantitatives Arbeiten erschien es möglich, die bei der Reaktion auftretenden einzelnen Erscheinungsfaktoren zu bewerten und die eigentliche Natur der Erscheinung zu bestimmen.

Diese Arbeiten wurden im Juli 1908 durch Krankheit unterbrochen und können jetzt nicht wieder aufgenommen werden. Deshalb halte ich es für angezeigt, die bisher erhaltenen Ergebnisse zu veröffentlichen; denn wenn die Resultate auch noch nicht genügen, um daraus bindende Schlüsse

---

1) Diese Arbeit wurde auf Grund einer "Fellowship" des Rockefeller Institute for Medical Research, New York City, ausgeführt.

zu ziehen, so gestatten sie doch, eine ganze Reihe von Vermutungen zu äußern, welche gerade in dem gegenwärtigen Stadium der Komplementbindungsforschungen von besonderem Werte sein können.

Als Material für die Untersuchungen wurden verwendet Hammelblutkörperchen, Meerschweinkomplement und Kaninchenambozeptor, wie diese für die laufenden Wassermann-Reaktionen im Institut gebraucht werden. Es erschien indessen notwendig, die gewöhnliche Untersuchungstechnik etwas abzuändern, um die Reaktion für quantitative Versuche brauchbar zu machen. Bei den gewöhnlichen Wassermann-Reaktionen wird die geringste zur vollständigen Hämolyse nötige Ambozeptorendosis durch Vorversuche festgestellt und der so gewonnene Titer bei den eigentlichen Versuchen in doppelter oder dreifacher Menge angewendet. Dadurch werden bei den eigentlichen Versuchen die roten Blutkörperchen einer Menge von Hämolsin ausgesetzt, die erheblich größer ist, als notwendig wäre, um eine vollständige Hämolyse herbeizuführen; infolgedessen sind geringere Schwankungen der lytischen Kräfte gar nicht festzustellen; es kommen vielmehr nur solche Veränderungen zur Beobachtung, welche zu einem vollständigen oder nahezu vollständigen Verlust dieser Fähigkeit führen. Eine Zunahme der lytischen Wirkungen, wie sie vielleicht bei einzelnen Versuchen erfolgen kann, ist so gar nicht festzustellen.

Fig. 1. Die Wassermannsche Reaktion. Die Kurve *ABb* stellt die Veränderungen dar, welche die hämolytische Wirksamkeit nach Zusatz wachsender Mengen verdünnten (10-proz.)luetischen Leberextraktes einem 88-proz. hämolytischen System (0,1 ccm Meerschweinchenkomplement + etwas weniger Ambozeptor, als dem ermittelten Titer entspricht) gegenüber unter den Bedingungen der gewöhnlichen Wassermannschen Reaktion erleidet. *ACc* gibt die entsprechenden Veränderungen bei Zusatz verdünnten (10-proz.), in der Hitze inaktivierten syphilitischen Menschenserums und *ADd* die bei normalem Serum wieder. Die steil abfallende Kurve zeigt bei jeder Figur die Erscheinungen, die bei gleichzeitiger Einwirkung von Extrakt und Serum auftreten. So sind bei *ABMN* (I) die geringen Veränderungen (*AB*) zu sehen, die anfangs bei Zusatz von Leberextrakt entstehen, bis eine plötzliche, fast vollständige Zerstörung der hämolytischen Wirkung erfolgt, sobald man nunmehrluetisches Serum zusetzt. *ABQR* (III) zeigt, daß eine Vernichtung der hämolytischen Wirksamkeit fehlt, wenn man ebenso normales Serum prüft. *ACOP* (II) und *ADST* (IV) zeigen einen ähnlichen Unterschied; hierbei ist die Methode insofern verändert, als der Leberextrakt bei gleichbleibender Serummenge zugesetzt wurde. Teil I und II der Figur zeigen eine positive, III und IV eine negative Wassermannsche Reaktion.

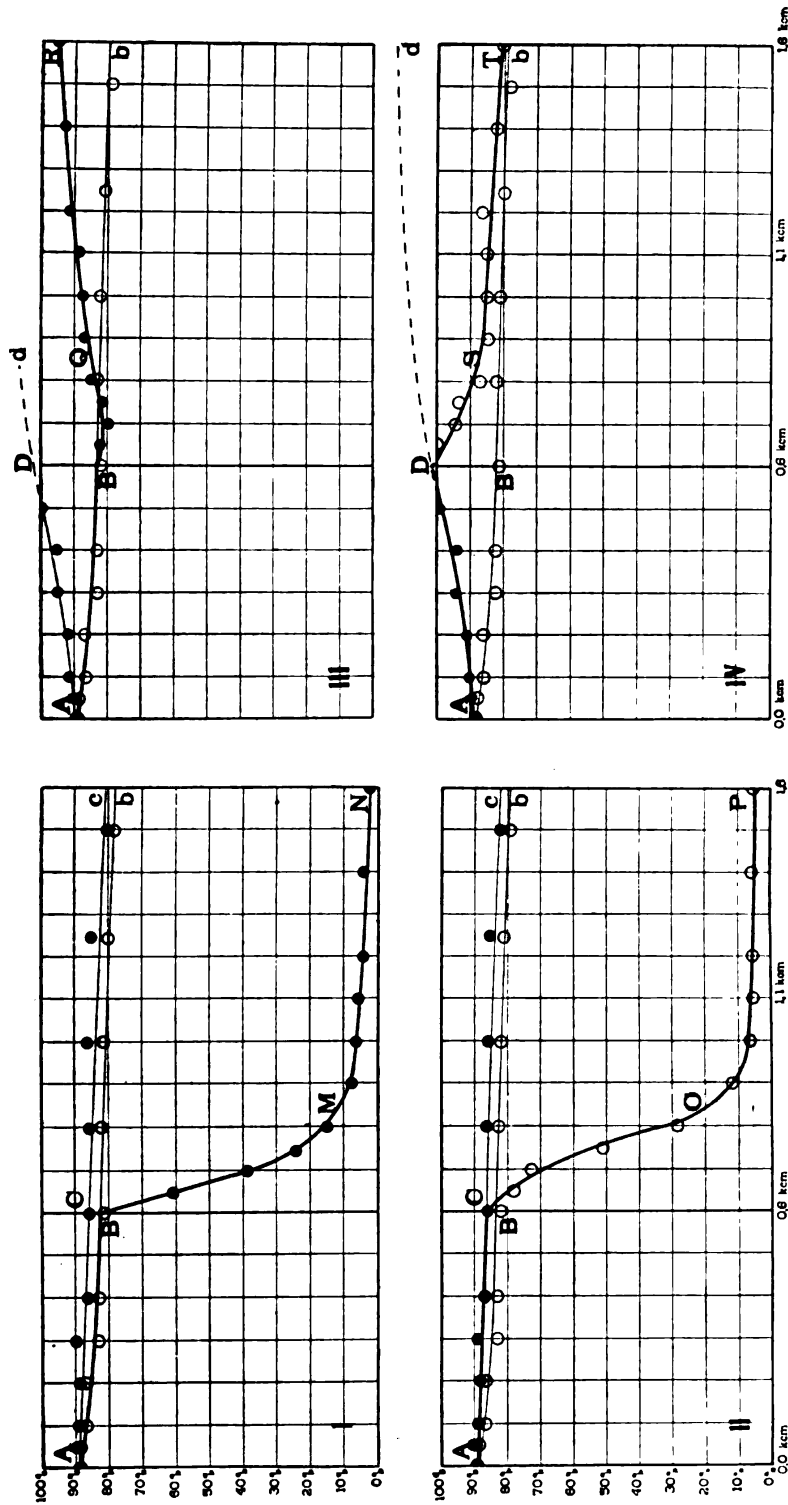


Fig. 1. Figurenerklärung siehe p. 310.

Diese ganze Erscheinung ließ sich in das Bereich einer quantitativen Bestimmung rücken, wenn man die bei den eigentlichen Versuchen zu nehmende Ambozeptordosis so weit reduzierte, daß sie dem festgestellten Titer gleich war, oder nur wenig größer als derselbe. Nach dieser Abänderung läßt sich die ganze Wassermannsche Reaktion graphisch darstellen. Eine solche Versinnbildlichung sieht man in der Fig. 1 (I, II); in derselben stellt die Kurve *ABb* die Veränderungen der hämolytischen Wirksamkeit<sup>1)</sup> dar, wenn man wachsende Mengenluetischen Leberextraktes dem Wassermannschen hämolytischen System zusetzt; *ACc* stellt in entsprechender Weise die Veränderungen bei Zusatz wachsender Mengen inaktiviertenluetischen Serums dar, und *BMN* und *COP* das so gut wie völlige Ausbleiben der hämolytischen Wirkung (Wassermannsches Phänomen), wenn eine der beiden Substanzen bei Anwesenheit der anderen zugesetzt wird. Die Wirkung normalen Serums (negative Wassermannsche Reaktion) läßt sich ebenso leicht darstellen und findet sich in derselben Figur (III, IV). Hieraus ist bei den Kurven *BQR* und *DST* ersichtlich, daß die hämolytische Wirkung nicht wesentlich gehemmt ist, wenn normales Serum in Gegenwart von demselben Extrakt wirken kann.

Durch diese Abänderung der gewöhnlichen Wassermannschen Technik wird ein neuer Faktor in den Versuch nicht eingeführt; dies beweist Fig. 2, bei welcher die Er-

1) Die hämolytische Wirksamkeit wird hierbei kolorimetrisch bestimmt und in Prozenten der vollständigen Hämolyse ausgedrückt. Wie bei den regelmäßigen Wassermannschen Reaktionen läßt man bei diesen Bestimmungen die zu untersuchende Substanz oder Substanzmischung eine Stunde lang im Brutschrank auf das Komplement einwirken; dann erst werden die sensibilisierten Blutkörperchen zugesetzt. Diese Gemische läßt man 2 Stunden lang bei 37,5° stehen. Nun stellt man sie in einen Kühltisch, bis die ungelösten Blutkörperchen zu Boden gesunken sind (gewöhnlich 18 Stunden). Darauf wird die kolorimetrische Bestimmung vorgenommen. Die bei diesen Versuchen verwendeten Mengen sind mit geringen Abweichungen dieselben wie bei den laufenden Wassermannschen Reaktionen, nämlich: 1 ccm 10-proz. Meerschweinchenkomplement, 1 ccm Leberextrakt, 1 ccm 10-proz. inaktiviertes Menschenserum und 2 ccm 5-proz. sensibilisierte Hammelblutkörperchen (= 1 ccm 10-proz. Hammelblutkörperchen + 1 ccm verdünnte Ambozeptoren).

scheinungen parallel aufgeführt sind, je nachdem die Ambozeptorendosis zwischen dem Vierfachen des bestimmten Titors ( $A_4C_4O_4P_4$ ) und seiner Hälfte ( $A_0C_0O_0P_0$ ) schwankt. Diese vier hier dargestellten Kurven haben so ziemlich das gleiche

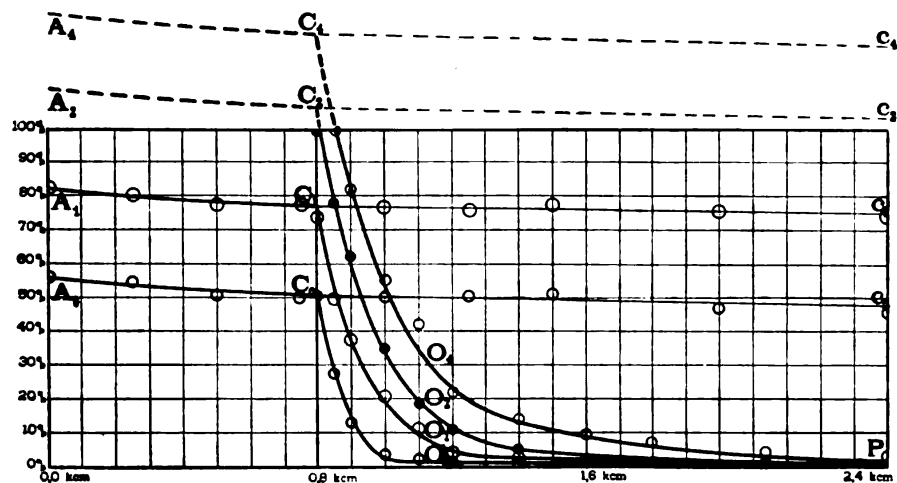


Fig. 2. Einfluß der Ambozeptormenge.  $A_4C_4O_4P$ ,  $A_3C_3O_3P$ ,  $A_2C_2O_2P$  und  $A_1C_1O_1P$  zeigen die hämolysenzerstörende Wirkung des Leberextraktes, der bei Anwesenheit gleichbleibender Mengen vonluetischem Serum<sup>1)</sup> einwirkt, während die zugesetzten Blutkörperchen mit der vierfachen, doppelten, einfachen und halben Menge des ermittelten Ambozeptortiters sensibilisiert sind. Die Kurve  $A_4C_4O_4P$  zeigt den Vorgang bei der gewöhnlichen Wassermannschen Methode,  $A_1C_1O_1P$  den bei der Methode, wie sie zu den vorliegenden Untersuchungen verwendet wurde. Beide Kurven zeigen im wesentlichen dieselben Erscheinungen und rechtfertigen damit die angewendete Methodik.

Aussehen; der einzige Unterschied zwischen ihnen ist der, daß bei den größeren Ambozeptorendosen, wo im Anfang die hämolytische Wirksamkeit 100 Proz. erheblich übersteigt<sup>2)</sup>,

1) Soweit nichts anderes bemerkt ist, sind bei diesen Versuchen alle Seren und Extrakte in 10-proz. Verdünnung verwendet worden.

2) Wenn die vorhandene Menge des Hämolysins größer ist, als für eine vollständige Lyse erforderlich ist, kann man ungefähr in ziemlich roher Weise die hämolytische Wirksamkeit abschätzen, wenn man die Reaktionszeit in Betracht zieht. Bei der hämolytischen Minimaldosis stellt sich die vollständige Hämolysen in  $1\frac{1}{2}$  bis 2 Stunden ein, während bei größeren Dosen die Lyse binnen viel kürzerer Zeit vollständig ist. Wenn man alle Viertelstunden nachsieht, kann man sich ungefähr ein Bild davon machen, wie die durch kolorimetrische Methoden nicht unmittelbar bestimmbaren Teile der Kurve aussehen.

ein nicht unbeträchtlicher Teil der Kurven hat theoretisch ergänzt werden müssen (punktierte Linie), während man bei den kleineren Ambozeptorendosen die Kurven direkt verfolgen kann.

Wenn man versucht, für die Wassermannsche Reaktion einen sicheren Maßstab zu finden, so liegt die größte zu

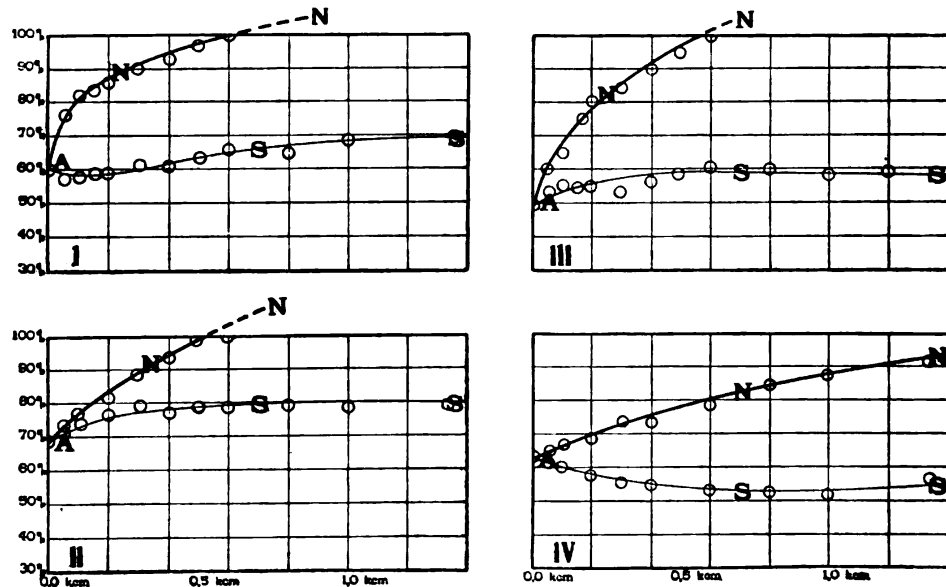


Fig. 3. Normale Serumauxilysine. Diese vier Versuche zeigen, daß normales, in der Hitze inaktiviertes Menschenserum eine verhältnismäßig starke hämolysenfördernde Wirkung hat (ANN), während bei den Kontrollversuchen mit inaktiviertem luetischen Serum diese Wirkung fehlt (ASS). Das Fehlen normaler auxilytischer Körper bei luetischen Seren spielt vermutlich bei der Wassermannschen Reaktion eine hervorragende Rolle.

überwindende Schwierigkeit in der mangelnden Konstanz und Haltbarkeit der Leberextrakte. Durch Anwendung der oben beschriebenen Methodik ließen sich Fingerzeige gewinnen, wie man Mittel zur Ausschaltung der Schwierigkeit finden könnte. Es wurde beobachtet, daß Seren, welche eine negative Wassermannsche Reaktion geben<sup>1)</sup>, unabhängige auxilytische oder hämolysenfördernde Kräfte besitzen (ANN

1) Für Ueberlassung der zu diesem Teil der Arbeit gebrauchten Seren, sowie die Diagnose bezüglich ihrer Reaktion bei der Wassermannschen Methodik bin ich dem Institutsassistenten, Herrn Dr. Georg Meier, zu Dank verpflichtet.

Fig. 3), während Wassermann-positive Seren solche Kräfte nicht aufweisen.

Indessen genügt die Zahl der auf die beschriebene Weise geprüften Seren noch nicht, um daraus Schlüsse auf die Gleichmäßigkeit oder Ungleichmäßigkeit des beobachteten Parallelismus ziehen zu können. Jedoch spricht für die Wahrscheinlichkeit, daß dieser Parallelismus gleichmäßig auftritt, und ferner dafür, daß die Wassermannsche Reaktion

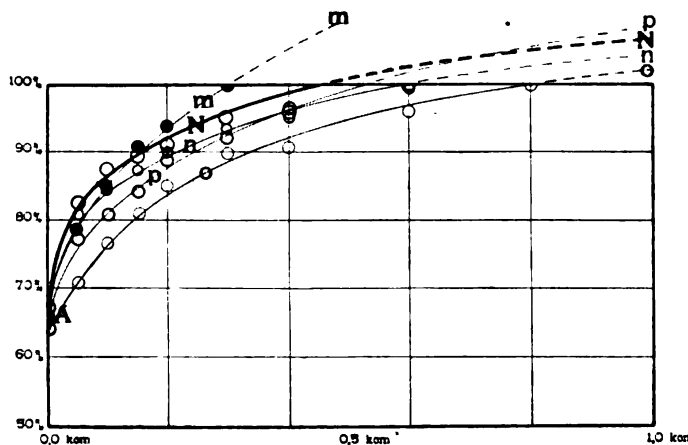


Fig. 4. Auxilytische Wirkung bei Anwesenheit von Leberextrakt. Durch Vorversuche wurden fünf hämolytische Systeme ausgesucht, die annähernd gleiche hämolytische Wirksamkeit (65-proz.) bei verschiedenem Gehalt an luetischem Leberextrakt zeigten. *ANN* zeigt die hämolysefördernde Wirkung von inaktiviertem normalen Menschenserum, das zu einem hämolytischen System zugesetzt ist, welches keinen Leberextrakt enthält. *Amm*, *Ann*, *Aoo* und *App* weisen annähernd gleiche Erscheinungen auf, bei einem Gehalt des hämolytischen Serums von 0,15, 0,3, 0,6 und 1,0 ccm Leberextrakt. Die Tatsache, daß das Auxilysin im normalen Serum in Gegenwart von Leberextrakt aktiv ist, beweist, daß der normale auxilytische Körper bei der Wassermannschen Reaktion ein nicht zu vernachlässigender Faktor ist.

wenigstens teilweise von einem Mangel der luetischen Seren an normalen auxilytischen Körpern abhängig ist, die Beobachtung, daß dieses Auxilysin in Gegenwart von luetischem Leberextrakt seine Wirksamkeit entfaltet (Fig. 4). Sollte dieser Parallelismus und diese kausalen Beziehungen endgültig bestätigt werden, so würde dies gestatten, die jetzt übliche Wassermannsche Methodik zu vereinfachen, indem der inkonstante, wenig haltbare Leberextrakt gänzlich entbehrlich würde, und an die Stelle der verhältnismäßig recht kompli-



zierten Komplementbindungsreaktion die relativ einfache Bestimmung der auxilytischen Wirkung träte<sup>1) 2)</sup>.

Des weiteren konnte beobachtet werden, daß zwischen der auxilytischen Wirkung normalen Serums und der Wirkung gewisser schwacher Alkalien eine Aehnlichkeit besteht, die vielleicht einen Parallelismus zwischen dem Alkalitäts- oder Aziditätsgrade erhitzter Seren<sup>3)</sup> und ihrem Verhalten bei der Wassermannschen Reaktion vermuten lassen könnte. Sollte sich auch dieser Parallelismus bestätigen, so könnte man sogar an die Möglichkeit denken, die hämolytische Reaktion ganz wegzulassen und dafür eine einfache chemische Titration vorzunehmen.

Ferner ließ sich feststellen, daß der Wassermannschen Reaktion quantitativ ganz gleiche Vorgänge sich auch mit unerhitztem Pferde-, Rinder- und Ziegenserum, sowie mit zahlreichen Laboratoriumssubstanzen erzielen lassen. Die Körper, welche solche Reaktionen geben, gehören hauptsächlich in zwei Gruppen: 1) Säuren und 2) Körper, welche Kofermente oder Fermentstimulatoren enthalten<sup>4)</sup>.

1) Falls jemand diesen Parallelismus näher nachprüfen will, so ist es rätlich, zu auxilytischen Bestimmungen eine Ambozeptorendosis zu wählen, welche für eine 30-proz. Hämolyse genügt. Es konnte beobachtet werden, daß ein 30-proz. hämolytisches System eine maximale Empfindlichkeit gegenüber Auxilytsinen hat.

2) Anmerkung während der Korrektur. Diese auxilytische Substanz ist vermutlich identisch mit den Hammelblutkörperchen-Ambozeptoren, die kürzlich von verschiedenen Autoren beschrieben worden sind. Später vorgenommene Bestimmungen haben den Beweis erbracht, daß die Menge dieses Ambozeptors, welche bei verschiedenen Proben menschlicher Seren erheblichen Schwankungen unterliegt, zu der Reaktion des Serums bei der Wassermannschen Probe in keiner konstanten Beziehung steht.

3) Bei 55—56° eine halbe Stunde lang inaktiviert.

4) Die Wirksamkeit körperlicher Enzyme hängt wahrscheinlich stets ab von der Anwesenheit mindestens zweier chemischer Körper: 1) einem an sich inaktiven thermolabilen Ferment und 2) einem beständigeren Koferment oder Fermentaktivator. Die Natur dieser Kofermente ist noch unbekannt, jedoch vermutet man, daß einige davon mit dem Lecithin nahe verwandt sind (Glyzerophosphate). Unter einem Fermentstimulator versteht man einen Körper, der zwar an sich zu einer Enzymwirkung nicht unbedingt nötig ist, diese Wirkung aber erheblich befördern kann. Als Beispiel für eine Fermentstimulation sei die Wirkung des Natriumphosphats auf die proteolytischen Enzyme in Hefepreßsaft angeführt.

Diese Beobachtung genügt, um die Aufstellung des Satzes zu gestatten, daß die wirksamen Prinzipien im Serum und Leberextrakt die in ihnen enthaltenen Säuren, Kofermente und Fermentstimulatoren sind, insbesondere die Aminosäuren und einfachen Polypeptide, die bei der Autolyse der Leber entstehen, sowie die Konfermente der Zelltätigkeit. Sollte dieser Satz bestätigt werden, so würde man daraufhin nicht nur eventuell den unzuverlässigen Leberextrakt durch eine Anzahl gleichmäßigerer Mischungen von organischen Säuren und synthetischen Kofermenten ersetzen können, sondern auch neue Gesichtspunkte bezüglich der Art der Vorgänge bei der sogenannten Ablenkung und ein anderes Bild von seiner angenommenen Spezifität oder Nichtspezifität bei Krankheiten gewinnen.

Durch Zufall wurde beobachtet, daß die meisten gewöhnlichen Bakteriennährböden zu den Substanzen gehören, die eine solche Reaktion geben können: dies verdanken sie wahrscheinlich ihrem hohen Peptongehalt. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß beim Arbeiten mit Bakterienemulsionen und mit den bakteriellen Stoffwechselprodukten Versuchsfehler leicht unterlaufen können.

Quantitative Versuche über Autolyse von Meerschweinchenkomplement weisen darauf hin, daß in Meerschweinchen Serum wahrscheinlich ein proteolytisches Ferment vorhanden ist, welches innerhalb der Zeit und bei den Verhältnissen in der Wassermannschen Reaktion das Komplement vollständig zu zerstören imstande ist. Diese Autolyse ist so deutlich, daß man sich zu der weiteren Vermutung veranlaßt sehen kann, die Abnahme der hämolytischen Wirksamkeit bei der Wassermannschen Reaktion sei nicht auf eine Bindung des Komplementes durch Antikörper, sondern auf eine Zerstörung des Komplementes durch autolytische Enzyme zurückzuführen, welche von Säuren, Kofermenten und Fermentstimulatoren des menschlichen Serums und des Leberextraktes aktiviert und unterstützt würden.

Diese Vermutung findet eine Stütze in der Beobachtung, daß die Anwesenheit des Ambozeptors während des Vorganges der Bindung das Komplement nicht schützt (Fig. 5), wie er es wohl tun müßte, wenn der Vorgang lediglich in einer

Bindung von Komplement an andere Körper bestünde. In-  
dessen verschwinden sowohl Komplement als Ambozeptor als  
solche aus der Lösung. Die Beobachtung rollt gleichfalls die  
Frage auf, ob die Wassermannsche Reaktion tatsächlich,  
wie allgemein angenommen wird, lediglich in einer Einwirkung

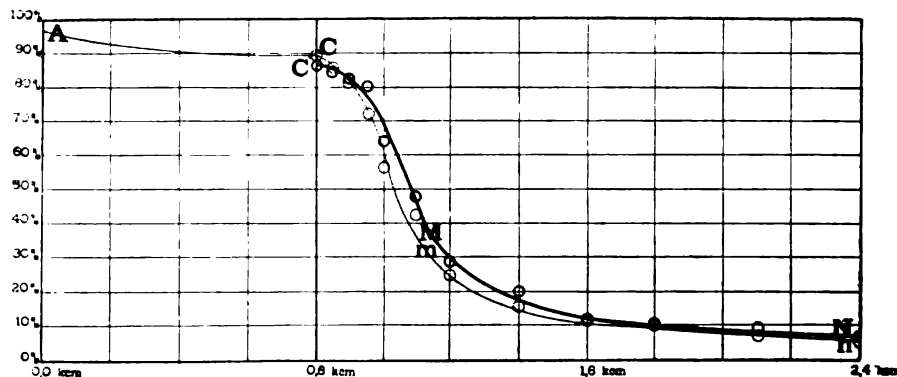


Fig. 5. Einfluß des Ambozeptors auf den Vorgang der Ablenkung. *ACmn* stellt die gewöhnliche Komplementablenkungsreaktion mit Meerschweinchenkomplement, Leberextrakt und luetischem Serum dar, während *C'MN* den gleichen Vorgang mit Meerschweinchenkomplement und der doppelten Ambozeptorentiterdosis veranschaulicht. Die Tatsache, daß die beiden Kurven innerhalb der Grenzen von Versuchsfehlern parallel verlaufen, beweist 1) daß die Gegenwart eines Ambozeptors das Komplement nicht vor dem Vorgang der Ablenkung schützt, und 2) daß der Ambozeptor seinerseits auch abgelenkt oder zerstört werden kann.

auf das Komplement besteht oder ob sie nicht eine kombinierte Einwirkung auf Komplement und Ambozeptor einschließt. Diese doppelte Wirksamkeit ist wohl möglich, da ja die sensibilisierten Blutkörperchensuspensionen viele freie Ambozeptoren enthalten.

Weiterhin wurde gefunden, daß es eine Pseudoablenkung gibt, eine Häufungserscheinung, die leicht für den Vorgang selbst gehalten werden kann. Diese Pseudoerscheinung kann eventuell zu Versuchsfehlern und Trugschlüssen Veranlassung geben. Auch ließ sich beobachten, daß wahrscheinlich ganz bestimmte mathematische Beziehungen zwischen den reagierenden Körpern bestehen, die auf die Annahme physikalisch-chemischer Gesetze hinweisen.

Am Ende dieser Uebersicht sei jedoch noch einmal betont, daß die aufgeführten Gesichtspunkte lediglich als vorläufige Hypothesen für fernere Arbeiten, nicht aber als be-

wiesene Tatsachen gelten sollen. Ihre Veröffentlichung in einem solchen unfertigen Zustande wurde nur in dem Sinne vorgenommen, daß sie vielleicht als Richtlinien für weitere Arbeiten für die künftige Entwicklung der Komplementbindungstheorie nicht ohne Wert sein mögen.

## II. Experimenteller Teil.

### 1. Versuche mit menschlichem Serum.

Diese Versuche mit menschlichem Serum wurden vor allem angestellt, um eine für quantitative Bestimmung brauchbare Technik zu gewinnen. Ueber diese Versuche enthält der theoretische Teil dieser Mitteilung die hauptsächlichsten Angaben. Der Unterschied zwischen normalem undluetischem Serum bei Anwendung der eingeschlagenen Methodik ist in Fig. 1 dargestellt. Fig. 2 enthält einen Vergleich der bei dieser Methode gewonnenen Resultate mit den Ergebnissen der gewöhnlichen Technik; daraus erhellt, wie berechtigt die eingeschlagene Methodik ist. Aus Fig. 3 geht hervor, daß erhitztes normales Serum einen verhältnismäßig starken Körper enthält, und daß dieser Körper beiluetischen Seren gänzlich oder nahezu gänzlich fehlt, oder bei ihnen sogar durch einen schwachen antilytischen Körper ersetzt ist. Fig. 4 zeigt, daß dieses normale Auxilysin bei Anwesenheit vonluetischem Leberextrakt wirksam ist, und daß es demnach mehr oder weniger für den Unterschied verantwortlich zu machen ist, den man bei der Wassermannschen Methode zwischen der Wirkung normalen undluetischen Serums beobachten kann. Aus Fig. 5 endlich erhellt, daß die Anwesenheit eines Ambozeptors während des Vorganges der Ablenkung das Komplement nicht nur nicht schützt, sondern daß der Ambozeptor sowohl als auch das Komplement während dieses Vorganges gebunden oder zerstört werden.

Diese Versuche führten zu zwei grundlegenden Hypothesen: erstens, daß der positive Ausfall einer Wassermannschen Reaktion wenigstens zum Teil auf dem Fehlen normaler auxilytischer Körper in dem betreffenden Serum beruht, und zweitens, daß die Reaktion nicht eine Wirkung des Komplementes

allein, sondern eine kombinierte Wirkung von Komplement und Ambozeptor ist.

Ueber die Natur dieser normalen Auxilysine ist eine Hypothese nicht aufgestellt; jedoch die Aehnlichkeit zwischen ihrer Wirkungsweise und der gewisser Alkalien<sup>1)</sup> weist darauf hin, daß man sie einmal wird als alkalische Körper nachweisen können, die entweder im menschlichen Serum normalerweise vorhanden sind oder in ihm bei dem Vorgang der Inaktivierung in der Hitze gebildet werden. Eine solche angenommene Differenz der Alkalität könnte weiterhin verantwortlich gemacht werden für den Unterschied, den man zwischen der Wirkung normalen und luetischen Serums bei Anwesenheit von schwachen Säuren beobachten kann, wobei das stärker alkalische Serum die Säuren neutralisieren und Säure wie Serum inaktiv werden könnten.

## 2. Ablenkungserscheinungen bei tierischen Seren.

Es konnte beobachtet werden, daß eine Anzahl tierischer Seren Ablenkungserscheinungen boten, die quantitativ der Wassermannschen Reaktion gleich waren. Da man solche Seren leicht in großen Mengen erhalten kann, liefern sie ein für quantitative Versuche ganz besonders geeignetes Material. Es ließ sich erwarten, daß die bei solchen Bestimmungen gewonnenen Ergebnisse zur Aufklärung der Natur der Erscheinungen bei der Wassermannschen Reaktion beitragen würden.

Die Figuren 6, 7 und 8 geben die Resultate einer Anzahl solcher Bestimmungen mit Pferde-, Rinder- und Ziegen-serum wieder. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß man eine der Syphilisreaktion entsprechende Ablenkungserscheinung

Fig. 6. Ablenkungserscheinungen bei Pferdeserum. *ACc* (I) zeigt die Wirkung von 5-proz. Pferdeserum für sich allein, *ACEE* die Ablenkungserscheinung von 100-proz. menschlichem *Speichel*, wenn er in Gegenwart gleichbleibender Mengen von diesem Serum einwirkt, und in *Aee* ist die Wirkung dieses Speichels für sich allein dargestellt. Die übrigen untersuchten Stoffe sind unten zusammengestellt, wobei diejenigen, bei denen eine Ablenkungserscheinung auftritt, durch *Kursivschrift* hervorgehoben sind.

1) Vergl. den folgenden Abschnitt.

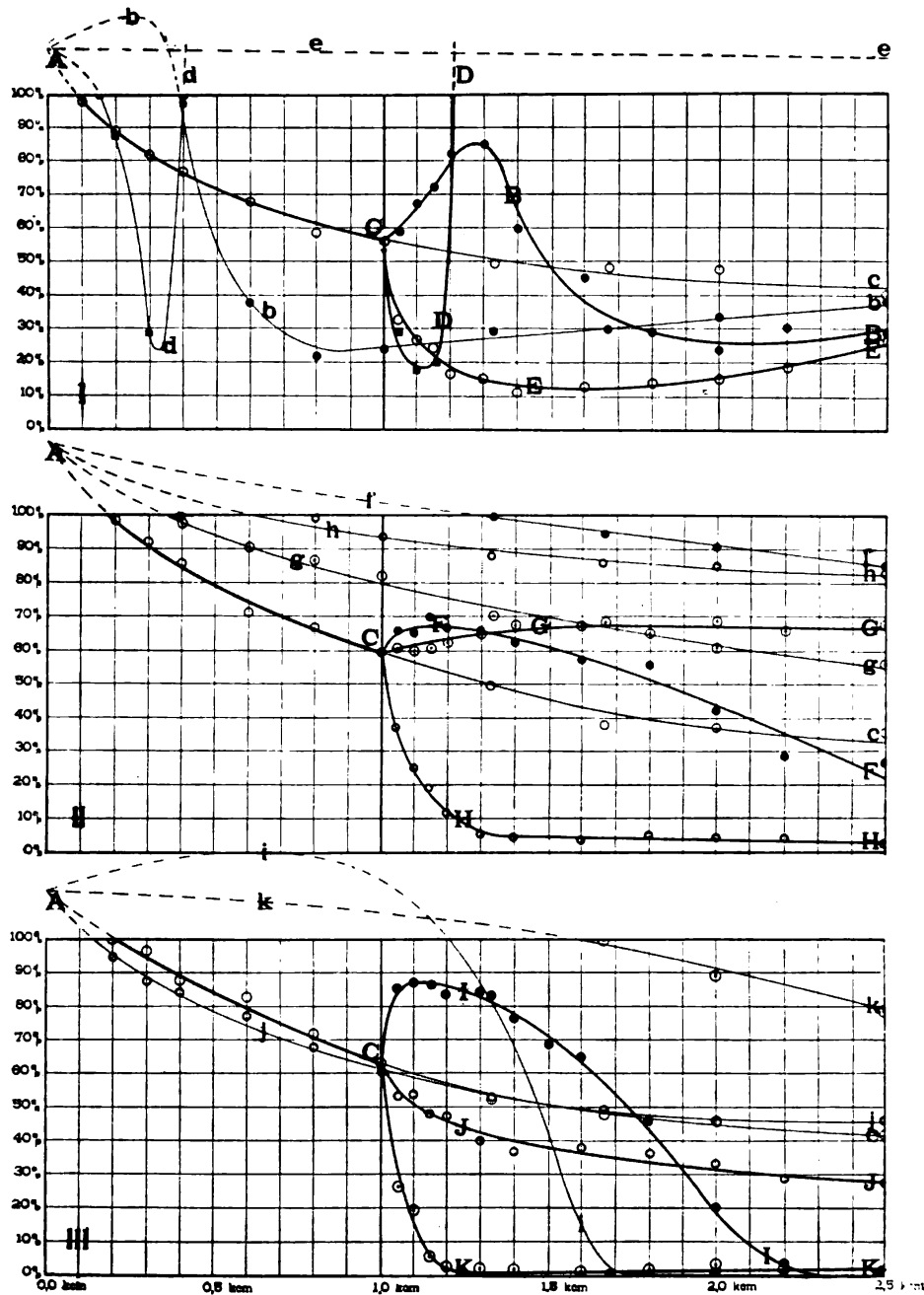


Fig. 6. Teil I—III. Figurenerklärung siehe p. 320.

I.  $Abb, ACBB = \frac{n}{40} Na_2CO_3,$

II.  $Aff, ACFF = 1\text{-proz. } MgCl_2,$   
 $Agg, ACGG = 10\text{-proz. Rinder-}$

$Add, ACDD = \frac{n}{40} \text{ Salzsäure.}$

$Ahh, ACHH = 5\text{-proz. Tuber-}$   
 $kulin.$

III.  $Aii, ACII = \frac{1}{4}\text{-proz. Trypsin,}$   
 $Ajj, ACJJ = 5\text{-proz. Ziegen-}$   
 $Akk, ACKK = \frac{1}{50}\text{-proz. Lecithin.}$

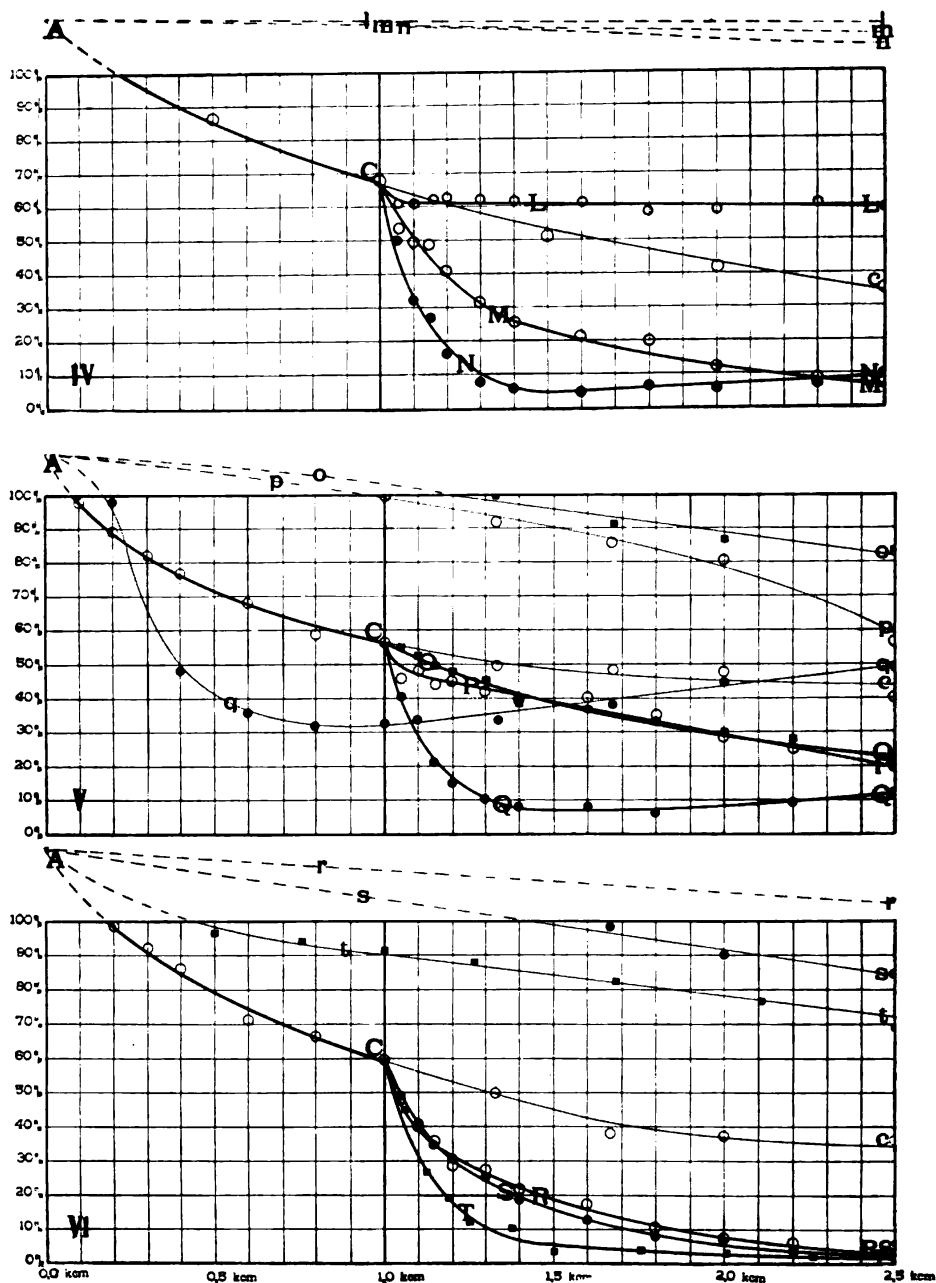


Fig. 6. Teil IV—VI. Figurenerklärung siehe p. 320.

IV. *All*, *ACLL* = 1-proz. Glyzerin,  
*Amm*, *ACMM* =  $\frac{1}{2}$ -proz. Gly-  
 kokoll,  
*Ann*, *ACNV* = 10-proz. Malz-  
 extrakt.

V. *Aoo*, *ACOO* =  $\frac{1}{4}$ -proz.  $\text{CaCl}_2$ ,  
*App*, *ACPP* =  $\frac{1}{35}$ -proz. grüne  
 Seife (unrein),  
*Agg*, *ACQQ* = 10-proz. lueti-  
 scher Lebereextrakt.

VI. *Arr*, *ACRR* = 10-proz. Milch,  
*Ass*, *ACSS* =  $\frac{1}{2}$ -proz. Pepsin,  
*Att*, *ACTT* =  $\frac{1}{3}$ -proz. Labferment.

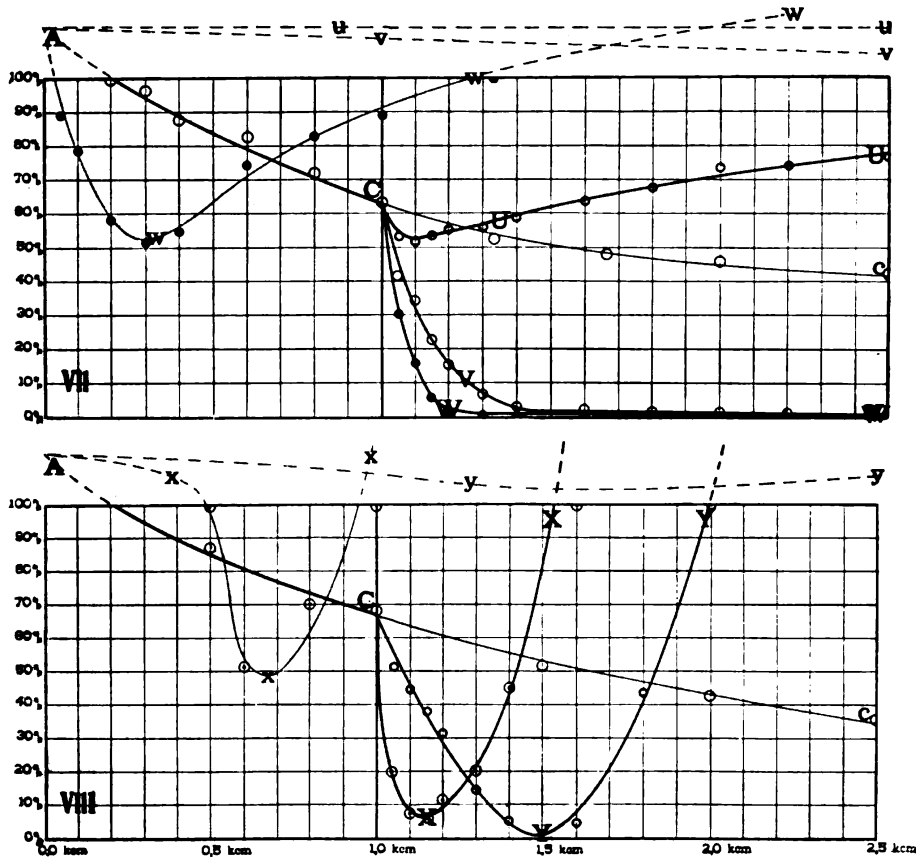


Fig. 6. Teil VII—VIII. Figurenerklärung siehe p. 320.

VII. *Auu*, *ACUU* = 10-proz. Ei-  
albumin,  
*Avv*, *ACVV* = 40-proz. Bouil-  
lon,  
*Aww*, *ACWW* = 5-proz. Hefe-  
preßsaft.

VIII. *Axx*, *ACXX* =  $\frac{n}{50}$  Phosphor-  
säure,  
*Ayy*, *ACYY* =  $\frac{1}{10}$ -proz. Oel-  
säure.

erhalten kann mit diesen Seren<sup>1)</sup> und Bouillon, Glykokoll, Hefepreßsaft<sup>2)</sup>, Lecithin, Leberextrakt, Malzextrakt, Milch, Pepsin (erhitzt und unerhitzt), Pepton, Lab (erhitzt und un-

1) Diese Seren wurden nicht durch Hitze inaktiviert, wie bei der gewöhnlichen Wassermannschen Technik, da sich herausstellte, daß keines von ihnen mit seinem Komplement Kaninchenambozeptoren aktivieren kann. Diese Aenderung der Technik hat, wie in einem späteren Abschnitt gezeigt werden soll, keine wesentliche Aenderung der Vorgänge zur Folge.

2) Für Ueberlassung des zu diesen Versuchen verwendeten Hefepreßsaftes bin ich Herrn Professor Eduard Buchner (Kgl. Landwirtschaftliche Hochschule in Berlin) zu Dank verpflichtet.



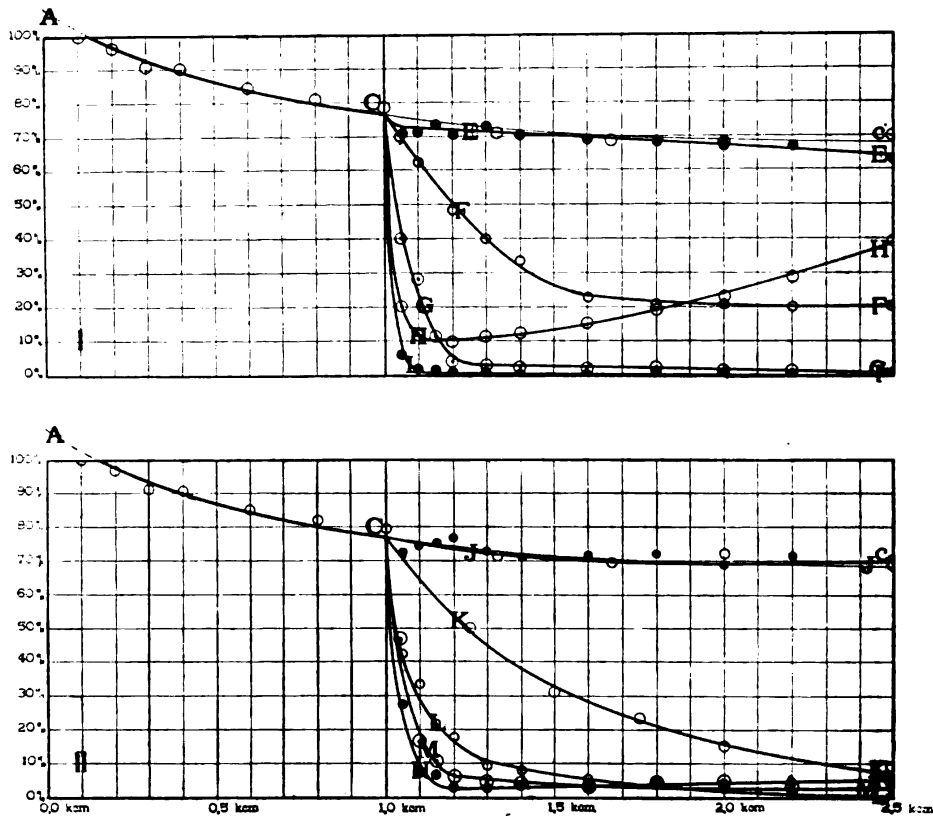


Fig. 7A. Ablenkungserscheinungen bei Rinderserum. Positive Ablenkungserscheinungen wurden in Gegenwart gleichbleibender Mengen von (10-proz.) Rinderserum beobachtet bei folgenden, durch *Kursivschrift* gekennzeichneten Stoffen:

I. *ACEE* = 1-proz. Stärke,  
*ACFF* = 10-proz. Milch,  
*ACGG* =  $\frac{1}{2}$ - „ Labferment,  
*ACHH* = 75- „ Speichel,  
*ACII* = 1- „ Pepton.

II. *ACJJ* =  $\frac{1}{2}$ -proz. Gelatine,  
*ACKK* =  $\frac{1}{10}$ - „ Agar,  
*ACLL* =  $\frac{1}{2}$ - „ Pepsin,  
*ACMM* = 5- „ Tuberkulin,  
*ACNN* = 50- „ Bouillon.

erhitzt), Speichel, Tuberkulin und in geringerem Grade reinem Agar und erhitztem Hefepreßsaft.

Einen der Syphilisreaktion ziemlich analogen, jedoch etwas komplizierteren Vorgang konnte man erzielen mit Oelsäure, Phosphorsäure, und etwas schwächer mit Salzsäure. Keine Reaktion trat ein mit: Eialbumin, Calciumchlorid, reiner Gelatine, Glycerin, ölsaurem Kalium (unrein) und Stärke und mit Serum einer Tierart, wenn es in Gegenwart von Serum einer anderen Art wirkte. Eine der Syphilisreaktion entgegen-

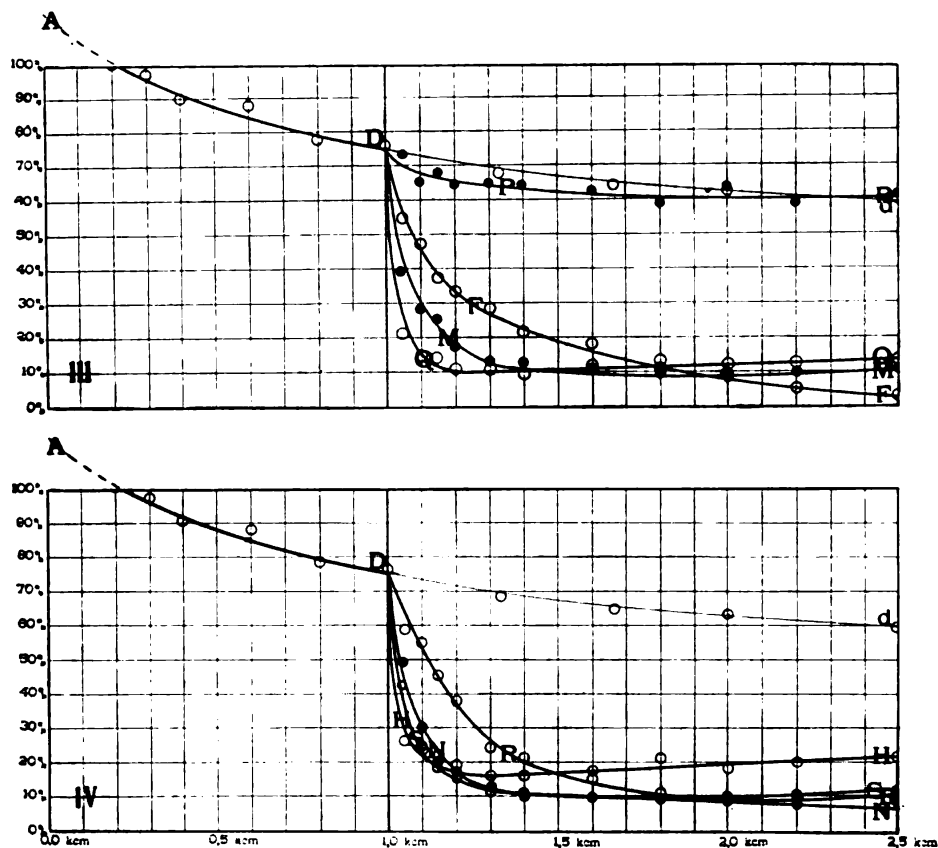


Fig. 7B. Ablenkungserscheinungen bei Ziegenserum. Positive Ablenkungserscheinungen wurden in Gegenwart gleichbleibender Mengen von (6-proz.) Ziegenserum beobachtet bei folgenden, durch *Kursiv-schrift* gekennzeichneten Stoffen:

- |  |   |
|--|---|
| III. <i>ADPP</i> = 10-proz. Rinder-                    | IV. <i>ADRR</i> = 6-proz. <i>luetischer</i> |
| serum,   | <i>Leberextrakt</i> ,                       |
| <i>ADFF</i> = 10-proz. <i>Milch</i> ,                  | <i>ADNN</i> = 50-proz. <i>Bouillon</i> ,    |
| <i>ADMM</i> = 5-proz. <i>Tuberkulin</i> ,              | <i>ADSS</i> = 5-proz. <i>Hefepreßsaft</i> , |
| <i>ADQQ</i> = $\frac{1}{100}$ -proz. <i>Lecithin</i> . | <i>ADHH</i> = 75-proz. <i>Speichel</i> .    |

gesetzte komplizierte Erscheinung trat auf bei Magnesiumchlorid, Natriumbikarbonat und Trypsin.

Die geprüften Stoffe lassen sich in folgendem Schema zusammenstellen:

a) Stoffe, welche mit normalen Tierseren die Erscheinung der Ablenkung geben.

1. Säuren: Glykokoll (Aminosäure), Oelsäure, Phosphorsäure, (Salzsäure).

2. Fermente: Hefepreßsaft, Lab, Malzextrakt, Pepsin, Speichel.
3. Kofermente und Fermentstimulatoren: Bouillon, erhitzter Lab, Leberextrakt, Lecithin, Milch (erhitzt), erhitztes Pepsin, Pepton, Tuberkulin, (erhitzter Hefepreßsaft).
4. Verschiedenes: (Agar).

b) Stoffe, welche mit solchen Seren die Erscheinung der Ablenkung nicht geben.

1. Alkalien: Glyzerin, ölsaures Kalium (unrein), Magnesiumchlorid (unrein), Natriumbikarbonat.
2. Fermente: Trypsin.
3. Verschiedenes: Eialbumin, Calciumchlorid, Gelatine, Stärke.

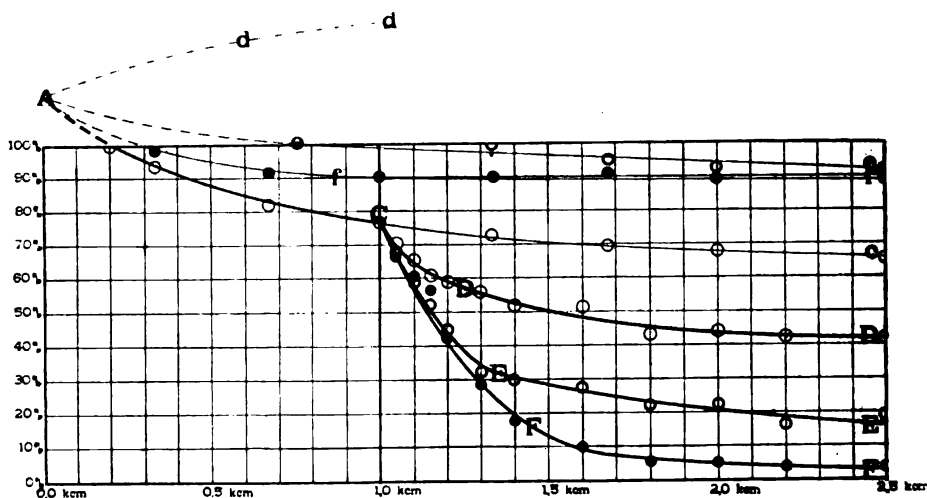


Fig. 8. Ablenkungserscheinungen bei in der Hitze inaktivierten Fermenten. In Gegenwart von 10-proz. Rinderserum gibt  $\frac{1}{2}$ -proz. Pepsin (*Aee*, *ACEE*) und  $\frac{1}{2}$ -proz. Labferment (*Aff*, *ACFF*), beides durch 30 Minuten anhaltende Erhitzung auf 58° C inaktiviert, positive Ablenkungserscheinungen. Andeutungsweise gab 5-proz. inaktivierter Hefepreßsaft (*ACDD*) die Reaktion, trotz der in ihm bei Erhitzung gebildeten auxilytischen Körper (*Add*).

Diese Versuche führten zu zwei grundlegenden Hypothesen: erstens, daß das wirksame Prinzip im Serum und Leberextrakt bei der Ablenkungserscheinung die in ihnen enthaltenen Säuren, Kofermente und Fermentstimulatoren sind, und zweitens, daß die Unterschiede, die man zwischen normalem und

<i>ABcc</i> = 5-proz. Pferdeserum,	<i>ABDD</i> = 10-proz. inaktiviertes Rinder-
<i>ABdd</i> = 10-proz. Rinderserum,	deserum,
<i>ABee</i> = 10- " Ziegenserum No. I,	<i>ABEE</i> = 10-proz. inaktiviertes Zie-
<i>ABff</i> = 10- " " " II,	genserum No. I,
<i>ABCC</i> = 5-proz. inaktiviertes Pferde-	<i>ABFF</i> = 10-proz. inaktiviertes Zie-
serum,	genserum No. II.

Ueber die Herkunft dieser abnormen Fermente in luetischen Leberextrakten ließ sich irgend ein Anhalt nicht gewinnen. Es läßt sich vermuten, daß dieselben entweder von einer Anhäufung von Kernmaterialien in kongenital veränderten Lebern

23\*

(zellige Infiltration usw.) oder von Zelldegenerationen herkommen<sup>1)</sup>).

Man könnte vielleicht einwenden, daß auf Grund der beschriebenen Versuche allgemeine Hypothesen nicht dürften aufgestellt werden, weil diese Seren nicht durch Hitze inaktiviert wären. Indessen zeigt eine Serie von Kontrollversuchen (Fig. 9), daß solche Seren [Ziege<sup>2)</sup>] ihre ablenkenden Eigenschaften so gut wie unverändert beibehalten, auch nachdem das Komplement auf diese Weise vollständig zerstört ist. Das beweist, daß die Erscheinung der Ablenkung bei einem gegebenen Serum von dem Vorhandensein oder Fehlen seines Komplementes unabhängig ist, ausgenommen natürlich bei Seren, die Kaninchenambozeptoren zu aktivieren imstande sind.

### 3. Ablenkungs- und Pseudoablenkungserscheinungen.

Wenn man die eben mitgeteilten Versuchsergebnisse durchmustert, kann man feststellen, daß die meisten eine Ablenkung aufweisenden Stoffe auch antilytische Eigenschaften besitzen. Deshalb schien es nicht unmöglich, daß, wenn man die verschiedenen Stadien des Ablenkungsprozesses quantitativ untersuchte, man die Natur der Erscheinung näher würde erkennen können. Wenn eine gewisse Menge Pferdeserum die Wirkung einer vollen hämolytischen Dosis von 100 auf 80 Proz. herabsetzen kann, so müssen wir wissen, was für eine Wirksamkeit eine gegebene Menge Labferment gegenüber einer 80-proz. hämolytischen Dosis hat, ehe wir auf die Natur der Reaktion zwischen Pferdeserum und dem genannten Stoffe Schlüsse ziehen können. Es ist denkbar, daß eine Ablenkungserscheinung eintreten könnte; denn wenn auch das Labferment außerstande ist, bei einer vollen hämolytischen Dosis eine deutliche

1) Man darf nicht vergessen, daß man bei einer Gegenüberstellung von kongenital luetischen und normalen Lebern Organe vergleicht, die aus ganz verschiedenen zelligen Elementen aufgebaut sind. Während bei dem normalen Organ die Hauptmasse aus hochdifferenzierten Parenchymzellen besteht, setzt sich ein beträchtlicher Teil der luetischen Leber aus Zellen bindegewebiger oder endothelialer Natur zusammen. Es ist zu bedauern, daß bei der Herstellung von Extrakten nicht jedesmal zugleich eine sorgfältige histologische Untersuchung des verwendeten Organs stattfindet.

2) Die ablenkenden Eigenschaften des Pferde- oder Rinderserums werden durch Erhitzen so gut wie ganz zerstört.

Änderung der Wirkung herbeizuführen, so kann es doch die Wirkung einer Teildosis (80 Proz.) erheblich herabsetzen.

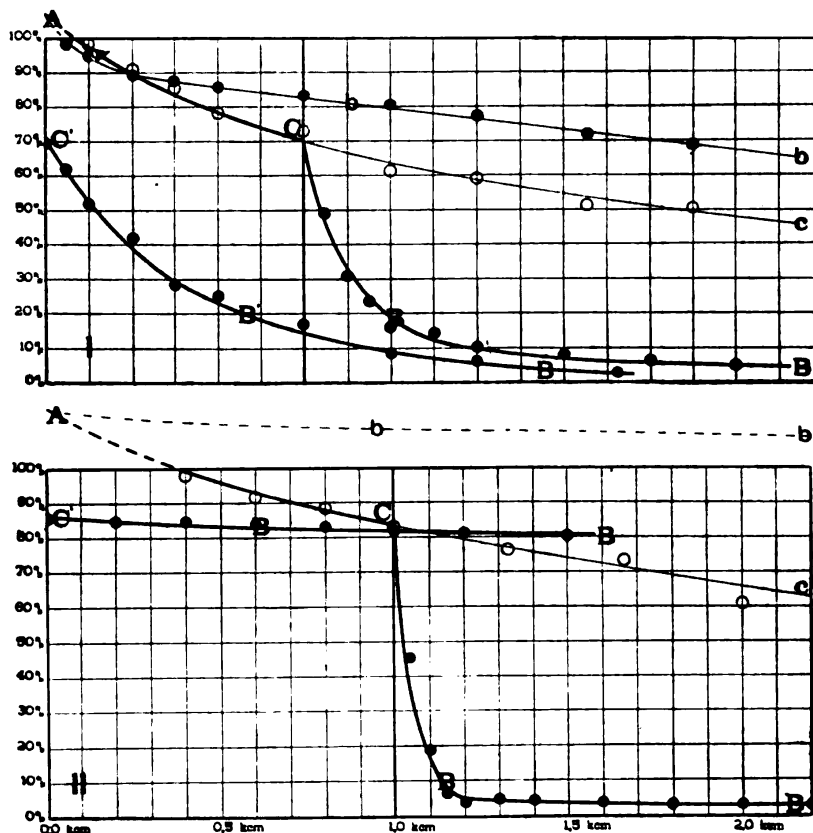


Fig. 10. Die Pseudoablenkungserscheinungen. *ACBB* (I) zeigt die hämolysenhemmende Wirkung von  $\frac{1}{5}$ -proz. Labferment, wenn solches in Gegenwart von 5-proz. Pferdeserum einwirkt. *Abb* stellt die schwache Wirkung, die dieses Ferment für sich allein einer vollen hämolysischen Dosis gegenüber hat, dar, und *C'B'B'* seine starke Wirkung gegenüber einer geringeren (70-proz.) hämolysischen Dosis. Der ähnliche Verlauf der beiden Kurven bei *CBB* und *C'B'B'* legt die Vermutung nahe, daß der Vorgang bei Pferdeserum und Labferment eigentlich eine Pseudoablenkung, eine Summationserscheinung zwischen zwei unabhängigen antilytischen Körpern ist.

*ACBB* (II) zeigt eine ähnliche hämolysenhemmende Wirkung bei gewöhnlicher Nährbouillon, die in Gegenwart von 5-proz. Ziegenserum einwirkt. Da die Bouillon für sich allein eine hämolysenhemmende Wirkung weder einer vollen noch einer geringeren (85-proz.) hämolysischen Dosis gegenüber hat (*Abb*, *C'B'B'*), wird man diese Reaktion nicht als eine Summationserscheinung auffassen können.

Bei der oben angeführten Reaktion zwischen Pferdeserum und Labferment ist dies in der Tat der Fall (Fig. 10 I); Lab-

ferment ist tatsächlich imstande, dieselbe Hemmung der Hämolyse bei der reduzierten Dosis zu veranlassen, wie es die

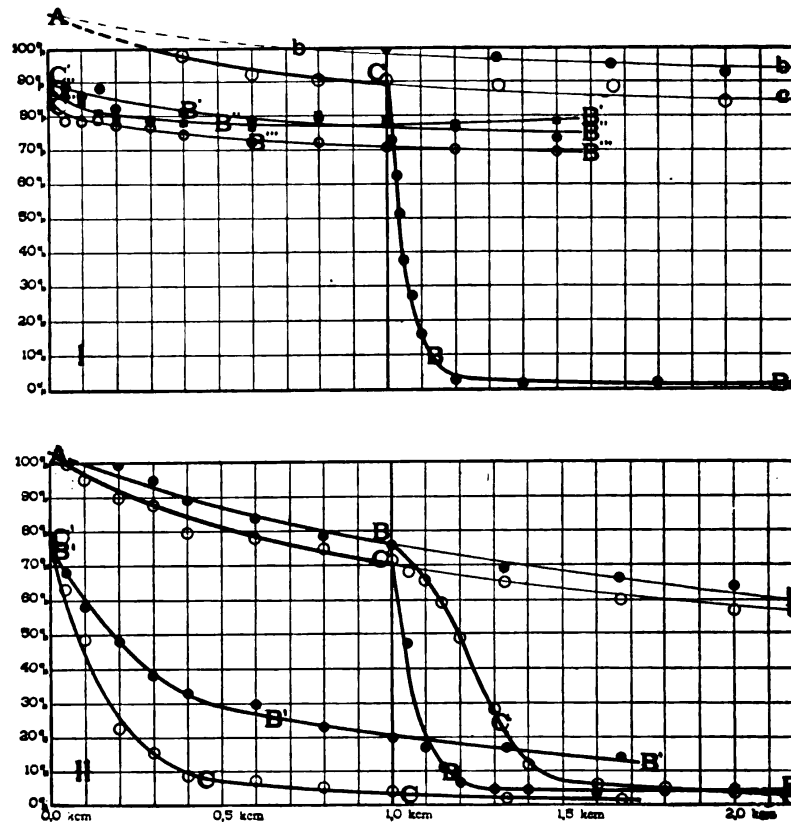


Fig. 11. Die Pseudoablenkungserscheinung. Bei I ist die Reaktion zwischen 2-proz. Pepton und 10-proz. Rinderserum in derselben Weise wie bei Fig. 10 dargestellt; es ist ersichtlich, daß das Pepton für sich allein einem geringeren (90-proz.) hämolytischen System gegenüber eine antihämolytische Wirkung nicht hat. Diese Wirkung wurde bei drei verschiedenen geringwertigen Hämolytinen geprüft.  $C'B'B'$  zeigt dieselbe Probe mit einem geringeren Hämolytin, das die normale Komplementmenge und eine geringere Menge Ambozeptoren hat;  $C''B''B''$  hat normale Ambozeptoren und verringertes Komplement, während bei  $C'''B'''B'''$  Ambozeptor wie Komplement reduziert sind.

Bei II ist eine ähnliche Reaktion zwischen 10-proz. Rinderserum und 50-proz. Tuberkulin dargestellt; Rinderserum ( $BCC$ ) sowohl als auch Tuberkulin ( $C'B'B'$ ) haben, wie ersichtlich, deutliche antihämolytische Wirkung gegenüber einem schwächeren (70-proz.) hämolytischen System. Man wird also annehmen müssen, daß die Wirkung zwischen Rinderserum und Tuberkulin eine Pseudoablenkungs-, eine Summationserscheinung ist.

entsprechende Mischung einer vollen hämolytischen Dosis bei Pferdeserum tut. Die Hämolysehemmung muß also wahr-

scheinlich als eine Summationserscheinung zweier unabhängiger antilytischer Körper aufgefaßt werden.

Im Gegensatz zu dieser Feststellung ist in derselben Figur (II) die Analyse der Wirkung von Ziegenserum und Bouillon wiedergegeben, wobei es sich zeigt, daß die Bouillon auf ein solches hämolytisches Teilsystem eine selbständige antilytische Wirkung nicht besitzt. Die Wirkung des Ziegensersums und der Bouillon kann infolgedessen als eine Summationserscheinung nicht aufgefaßt, sondern muß auf gänzlich verschiedene Ursachen zurückgeführt werden.

Einen ähnlichen Gegensatz zeigt Fig. 11; hier stellt sich die Wirkung von Pferdeserum und Pepton als eine echte Ablenkungserscheinung dar (I), während die zwischen Rinderserum und Tuberkulin wahrscheinlich eine Summationserscheinung ist.

Diese Versuche führen zu der Hypothese, daß wahrscheinlich zwei verschiedene Faktoren bei den Erscheinungen mitwirken, die man gewöhnlich zu der Wassermanschen Reaktion rechnet. Der erste Faktor ist eine Summationswirkung von

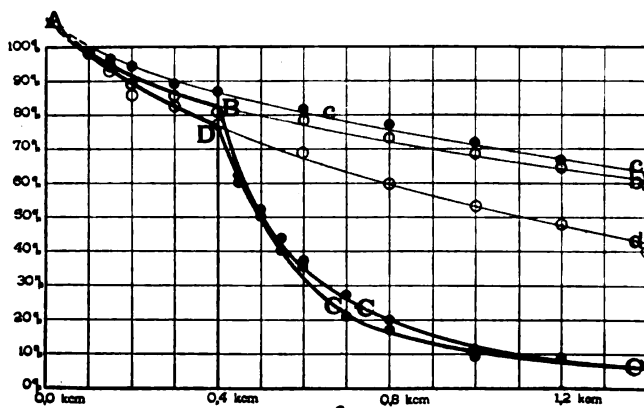


Fig. 12. Tuberkulin. Bei *ABCC* und *ADCC* stellt sich die hämolytisch-hemmende Wirkung des Serums eines Rindes dar, welches wiederholt mit menschlichem Tuberkulin injiziert worden war, und zwar zeigt *Acc* die Wirkung des Serums für sich allein, *ADd* in Gegenwart von menschlichem und *ABb* in Gegenwart von Rindertuberkulin. Da sich diese Reaktion bei den vorhergehenden Versuchen (Fig. 11) als eine Pseudoablenkungserscheinung herausgestellt hat, so kann man aus diesem Versuche irgendwelche Schlüsse nicht ziehen, weder bezüglich Vorhandenseins oder Fehlens tuberkulöser Antikörper im Serum des Rindes, noch bezüglich der biologischen Beziehungen zwischen menschlichen und bovinen Tuberkelbacillen.



selbständigen antilytischen Körpern, der andere Faktor sind durch gegenseitige Einwirkung auf chemischem Wege entstehende antilytische Körper. Einer dieser beiden Faktoren kann bei der Reaktion die Hauptrolle spielen, so daß die Erscheinung einer Ablenkung auftritt, sei es infolge reiner Summation, sei es infolge einer rein chemischen synthetischen Wirkung.

Dieses Ergebnis ist nicht nur von theoretischem, sondern auch von praktischem Interesse, zumal der einen der oben erwähnten Reaktionen, der zwischen Rinderserum und Tuberkulin, ein diagnostischer Wert beigemessen wird. Da diese Reaktion vermutlich nur eine einfache Summationserscheinung ist, die dem Wassermannschen Phänomen nur oberflächlich ähnelt, sind solche diagnostischen Reaktionen nicht beweisend. So kann man aus dem in Fig. 12 dargestellten Versuch, bei welchem die Reaktion des Serums eines öfters mit menschlichem Tuberkulin injizierten Rindes gegenüber menschlichem und bovinem Tuberkulin geprüft ist, irgendwelche Schlüsse bezüglich Vorhandenseins oder Fehlens von tuberkulösen Antikörpern oder bezüglich des Verhältnisses zwischen den verschiedenen Tuberkelbacillenstämmen nicht ziehen.

#### 4. Autolyse des Komplementes.

Ein Faktor, der möglicherweise eine große Rolle bei der Wassermannschen Reaktion spielt, ist die spontane Degeneration oder Autolyse des Meerschweinchenkomplementes. Es wurde vermutet, daß man Anhaltspunkte bezüglich einer eventuellen Bedeutung dieses Faktors würde gewinnen können, wenn man die Degeneration des Meerschweinchenkomplementes unter der Einwirkung schwacher Säuren und Alkalien untersuchte. Um diese Degeneration zu bestimmen, ließ man verschiedene Mengen sehr schwacher  $\left(\frac{n}{100}\right)$  Säuren und Alkalien auf gleiche Mengen Meerschweinchenkomplement einwirken, und zwar unter Verhältnissen und in Zeiträumen, wie bei der Ablenkungsperiode der Wassermannschen Reaktion. Dann wurden die Säuren und Alkalien neutralisiert und das übrig bleibende Komplement durch anschließende Hämolyse bestimmt.

Das Ergebnis eines solchen Versuches zeigt Fig. 13 (I) bei *FEDABC*. Man kann daraus ersehen, daß die spontane Degeneration durch das Vorhandensein schwacher Säuren er-

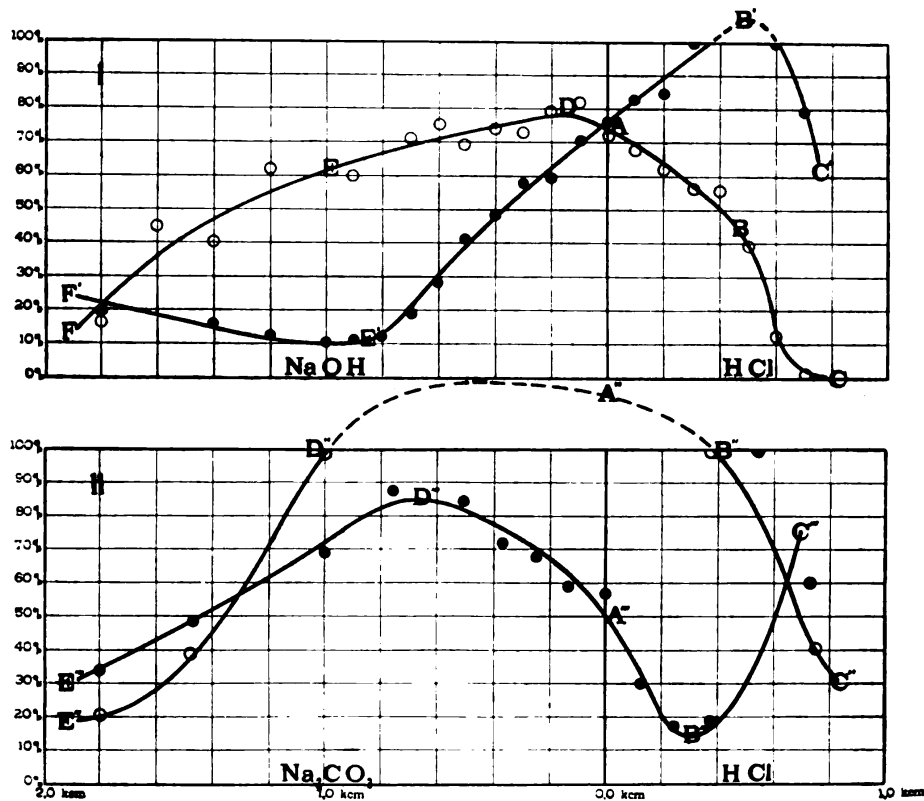


Fig. 13. Autolyse des Komplementes. *FEDABC* (I) zeigt die autolytische Zerstörung von Meerschweinchenkomplement in Gegenwart von  $\frac{n}{100}$  NaOH und  $\frac{n}{100}$  HCl; die Autolyse hat bei einem einstündigen Aufenthalt im 37° Brutschrank wie bei der Ablenkungsperiode der Wassermannschen Reaktion stattgefunden; dann wurde die Säure bzw. das Alkali neutralisiert und der Rest des Komplementes durch Zusatz sensibilisierter Blutkörperchen bestimmt. Bei *F'E'A'B'C'* (II) ist die Wirkung derselben Säure und desselben Alkali auf den eigentlichen hämolytischen Prozeß (natürlich gemeinsam mit ihrer entsprechenden Einwirkung auf die Autolyse) dargestellt, und bei *E''D''A''B''C''* (II) eine Verbindung der vorangehenden autolytischen Wirkung und der folgenden Hämolyse. *E'''D'''A'''B'''C'''* (II) zeigt diese selbe gemeinsame Wirkung bei Zusatz von 1,0 ccm 5-proz. Pferdeserum.

heblich beschleunigt wird; vollständige Zerstörung des Komplementes tritt ein, sobald bei den Versuchsbedingungen der

Wassermannschen Reaktion der Säuregrad  $\frac{n}{500}$  erreicht. In geringeren Mengen zugesetzte Alkalien hingegen hemmen diese normale Autolyse; bei Zusatz größerer Mengen ( $\frac{n}{150}$ ) indessen können sie zu einer vollständigen Zerstörung des Komplementes führen.

Im Zusammenhang damit war es ferner nötig, die direkte Wirkung desselben Körpers auf den Vorgang der Hämolyse zu bestimmen, da bei der Wassermannschen Reaktion die die Autolyse während der Ablenkungsperiode der Reaktion beeinflussenden Körper auch bei der folgenden hämolytischen Prüfung anwesend sind. Um diese zweite Wirkung zu bestimmen, wurden Säuren und Alkalien zu gleichen Komplementmengen zugesetzt und der Wirkung dieser Mischung sofort sensibilisierte Blutkörperchen unterworfen.

Das Ergebnis eines solchen Versuches zeigt  $F'E'A'B'C'$  (I). Daraus kann man ersehen, daß die Blutkörperchenlyse auch durch Säuren beschleunigt wird; die Hämolyse steigt rasch, bis die Säure eine Konzentration von  $\frac{n}{1000}$  erreicht. Dann findet ein steiler Abfall statt, vermutlich infolge Zerstörung des Komplementes. Alkalien hingegen bewirken von Anfang an einen Abfall der hämolytischen Wirkung; eine vollständige Hemmung der Hämolyse tritt ein, sobald die Konzentration  $\frac{n}{1250}$  erreicht, wobei nur eine geringe oder gar keine Zerstörung von Komplement eintritt.

Eine kombinierte Wirkung — erst autolytische Wirkung, dann blutkörperchenlösende Wirkung — sieht man bei  $E''D''A''B''C''$  (II); hieraus erhellt, daß schwache Säuren in dieser doppelten Rolle die Hämolyse auf den Nullpunkt herabdrücken, sobald die Konzentration  $\frac{n}{600}$  erreicht; auch Alkalien setzen in dieser doppelten Rolle die Hämolyse herab, indes nur, wenn sie in weit stärkerer Konzentration vorhanden sind.

Prüft man diese doppelte Wirkung in Gegenwart von Pferdeserum [ $E''D''A''B''C''$  (II)], so zeigt sich, daß Pferde-

serum die Fähigkeit hat, den Einfluß von Säuren erheblich zu vermehren und entsprechend den von Alkalien herabzusetzen. Bei Anwesenheit von Pferdeserum beobachtet man eine tatsächlich so gut wie völlige Hemmung der Hämolyse bei  $\frac{n}{1500}$  HCl.

Auf Grund dieser Versuche lassen sich folgende drei Hypothesen aufstellen: Erstens, daß im Meerschweinchen-serum ein verhältnismäßig starkes proteolytisches Ferment vorhanden ist. Dasselbe ist inaktiv in alkalischen Medien, schwach aktiv in neutralen und stark aktiv in sauren Medien, und findet sich in solchen Mengen vor, daß man es für die völlige Zerstörung des Komplementes in dem Zeitraum und unter den Verhältnissen der Wassermannschen Reaktion verantwortlich machen kann. Zweitens, daß im Leberextrakt und in Seren, welche eine positive Wassermannsche Reaktion geben, gewisse Stoffe, vermutlich Säuren, Kofermente und Fermentstimulatoren, vorhanden sind, welche die Wirkung dieses Ferments erheblich vergrößern können. Und drittens, daß die sogenannte Ablenkungserscheinung bei Syphilis ein Vorgang ist, der zum mindesten teilweise auf die durch dieses Ferment unter geeigneten Bedingungen der Reaktion des Mediums herbeigeführte Zerstörung des Meerschweinchenkomplementes zurückzuführen ist.

##### 5. Physikalisch-chemische Gesetze.

Es ist möglich, daß bei der Erscheinung der Ablenkung feste mathematische Beziehungen zwischen den reagierenden Stoffen obwalten. Darauf, daß dies in der Tat der Fall ist, weist Fig. 14 hin. Indessen genügen die Resultate noch nicht, um mehr als allgemeine Vermutungen über die eventuelle Natur solcher Beziehungen zu äußern. Offenbar ist eine Minimaldosis einer jeden reagierenden Substanz für eine vollständige Ablenkung notwendig; eine völlige Hemmung ist nicht möglich, wenn eine von den Substanzen in geringerer

Menge vorhanden ist. Und ein Ueberschuß einer dieser Substanzen über die Minimaldosis hinaus spielt offenbar bei der Reaktion keine Rolle. Dies spricht für die Bildung bestimmter

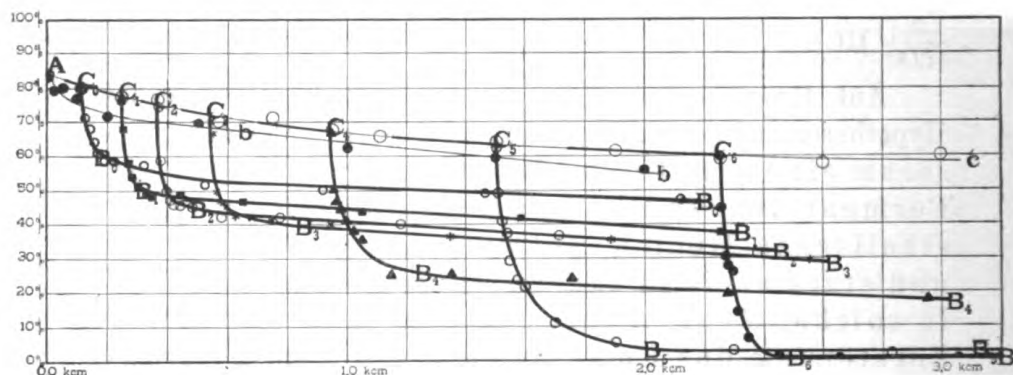


Fig. 14. Quantitative Beziehungen.  $AC_0B_0B_0$ ,  $AC_1B_1B_1$ ,  $AC_2B_2B_2$  usw. zeigen die hämolysenhemmende Wirkung von 4-proz. Pepton in Gegenwart von verschiedenen Mengen von 13-proz. Rinderserum. Dieser Versuch zeigt, 1) daß eine gewisse minimale Menge Pepton sowohl wie Rinderserum zu einer völligen Hemmung der Hämolysen nötig ist, und 2) daß bei dem Pepton eine Ueberschreitung dieser unteren Grenzen nach oben hin ohne besondere antihämolytische Wirkung ist. Parallelversuche, bei denen das Serum zu verschiedenen Mengen von Pepton zugesetzt wurde, zeigen in ähnlicher Weise die Wirkungslosigkeit des überflüssigen Serums.

chemischer Verbindungen; indessen hat sich ein Anhalt dafür, ob dieselben ihrer Natur nach Aufbauprodukte oder hydrolytische Spaltungsprodukte sind, nicht finden lassen.

#### 6. Schlüsse und allgemeine Gesichtspunkte.

Wenn auch die vorstehende, unterbrochne Arbeit zur Aufstellung von mehr als Versuchshypothesen nicht genügt, so reicht sie doch aus, um den folgenden Standpunkt festzulegen; von diesem Standpunkt aus ist die Wassermannsche Reaktion nicht als eine einzelne, isoliert dastehende Erscheinung aufzufassen, sondern als ein Glied aus einer langen Kette gleicher und entgegengesetzter Erscheinungen. Infolgedessen muß die landläufige Erklärung, daß die Erscheinung auf einer Komplementbindung durch spezifische Antikörper beruhe, nur im Sinne einer lediglich heuristischen Hypothese verstanden werden, denn:

1) lassen sich deutliche Erscheinungen hervorrufen bei Versuchen, in denen die Anwesenheit solcher Antikörper ausgeschlossen ist, und

2) gibt die Hypothese, daß die Erscheinung auf einer Zerstörung von Komplement durch proteolytische Enzyme beruht, eine ebenso haltbare Erklärung.

Von diesem Gesichtspunkte aus gewinnt die offenbare Spezifität der Reaktion ein ganz besonderes Ansehen, und weist auf das Vorhandensein früher nicht beachteter Faktoren auf dem Gebiete der Immunitätschemie hin. Die Wassermannsche Entdeckung ist also nicht als eine Ausdehnung unserer Kenntnisse auf dem gegenwärtig bekannten Gebiete der cytologischen Immunität zu betrachten, sondern als eine Pionierarbeit auf einem neuerschlossenen Gebiet der Serochemie, deren weiterer Ausbau vielleicht sehr wertvolle Aufschlüsse über die Vorgänge des Stoffwechsels geben und diagnostische und therapeutische Erfolge von weittragender Bedeutung zeitigen wird <sup>1)</sup>).

---

1) Bemerkung von A. Wassermann: Ich möchte nicht verfehlen, zu bemerken, daß die vorstehende Arbeit, wenn auch auf der mir unterstellten Abteilung des Institutes für Infektionskrankheiten ausgeführt, in ihren Schlußfolgerungen die persönlichen Ansichten des verehrten Herrn Verfassers wiedergibt. Diese schienen mir aber doch so anregend und interessant, daß ich trotz meiner in vielen Punkten abweichenden Stellung zu dem Gegenstand mit großem Vergnügen Herrn Kollegen Manwaring Gelegenheit gab, diese mühevollen Untersuchungen in meinem Laboratorium in so exakter Weise auszuführen. — Ich möchte indessen den Eindruck vermeiden, daß auch ich meinen von Anfang an eingenommenen Standpunkt betreffs des Vorhandenseins einer spezifischen Antigen-Komponente und demgemäß eines spezifischen „Antikörpers“ bei der Luesreaktion aufgegeben hätte.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Medizinischen Gesellschaft  
in Charkow.]

### **Ueber die Anwendung der Komplementbindungsmethode zur Untersuchung von Cholerafaeces.**

Von Dr. W. Nedrigailoff.

(Eingegangen bei der Redaktion am 21. Juli 1909.)

Die Zusammensetzung der Cholerafaeces ist wenig bekannt; es ist jedoch anzunehmen, daß sie spezifische Cholera-Antigene enthalten, und zwar in desto reinerem Zustande, je typischer der Stuhl aussieht. Sowohl von rein theoretischem, als auch von praktischem Standpunkte aus wäre es sehr interessant, festzustellen, ob man den Cholerastuhl als Antigen zur Anstellung der Bordet-Gengouschen Komplement-bindungsreaktion einem spezifischen Choleraimmunserum gegenüber anwenden kann.

Am 22. Februar dieses Jahres bot sich mir die Gelegenheit, Cholerafaeces in dieser Richtung hin einer Untersuchung zu unterwerfen. An diesem Tage wurden in das Institut Faeces einer an schweren Choleraerscheinungen erkrankten Frau zur Untersuchung eingeliefert.

Aus diesen Faeces wurden in üblicher Weise Vibrionen gezüchtet, die nach ihren morphologischen, biologischen und agglutinierenden Eigenschaften als typische Choleraerreger erkannt wurden. Die Faeces waren von flüssiger Konsistenz, grauweißlicher Farbe und alkalischer Reaktion. Nach Verimpfung eines Partikelchens des Stuhles auf eine Agarplatte kamen nach 10 Stunden typische Cholera Kolonien in ziemlich reichlicher Anzahl zur Entwicklung; es fanden sich außerdem Kolonien von Colibakterien. Die Faeces wurden in ein hohes Zylinderglas gebracht und nach dem Absetzen der obere flüssige Teil abgegossen. Diese Flüssigkeit wurde bei den weiteren Versuchen als Antigen benutzt. Als hämolytischen Ambozeptor benutzten wir eine Verdünnung (1:300) von Kaninchenserum, das durch Immunisierung mit Hammelblutkörperchen gewonnen war. Als Komplement wurde 1 ccm

einer 10-proz. Lösung von frischem Meerschweinchenserum angewandt. Unser Serum, das als Cholera-Ambozeptor benutzt wurde, stammte von einem Pferde, das längere Zeit mit Choleravibrionen immunisiert wurde. Als Kontrolle wurde gewöhnliches Pferdeserum benutzt.

Es wurde eine große Versuchsreihe mit verschiedenen Mengen Faeces und Choleraserum sowie anderen Seris angestellt.

Die Gemische der Faeces mit dem Cholera-Ambozeptor und Komplement wurden eine Stunde im Brutschrank bei 37° C gehalten, sodann wurden diesen Gemischen je 2 ccm eines Gemisches von gleichen Teilen 5-proz. Hammelblutkörperchen-Suspension und der Lösung (1:300) des hämolytischen Ambozeptors hinzugefügt. Vor dem Zusatz wurde dieses letztere Gemisch auf eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Die Reagenzgläser kamen wiederum auf 2 Stunden in den Brutschrank, wonach die Resultate des Versuches abgelesen wurden.

Diese Versuche haben folgendes ergeben:

1) Unser Cholera-Antigen löste Hammelblutkörperchen sogar in großen Dosen von 0,5 und 1,0 ccm nicht.

2) Dosen dieses Antigens von 0,5 und 1,0 ccm binden allein 0,1 ccm Komplement; kleinere Dosen binden nicht.

3) Normales Pferdeserum bindet das Komplement zusammen mit dem Antigen in verhältnismäßig großen Mengen von 0,2—0,3 ccm; Choleraimmunserum dagegen wirkt schon bei gleichen Bedingungen in sehr geringen Mengen von 0,01 und 0,005 ccm.

4) Bei mittleren Mengen des Choleraimmunserums (0,05 ccm) erzeugte unser Antigen eine Komplementbindung in Mengen von 0,1, 0,2 und 0,3; geringere Mengen (0,05) des Antigens wirkten nicht mehr, größere, wie schon erwähnt wurde, banden auch ohne spezifisches Serum.

Außer dem Charkower Immunserum prüften wir auch bei unseren Versuchen die Choleraimmunsera von Kraus und Schurupoff. Dieselben erwiesen sich in bezug auf ihren Gehalt an spezifischen Ambozeptoren als mit unserem Serum gleichwertig.

Andere Immunsera — es wurden geprüft: typhöses, Dysenterie- und Diphtherieserum — verhielten sich wie normales Pferdeserum.



Diese Versuche überzeugten mich also, daß Cholerafaeces die Elemente eines spezifischen Cholera-Antigens enthalten.

Es war mir ferner interessant, aufzuklären, ob die Cholera-vibrionen allein als Träger dieser Spezifität anzusehen sind, oder auch die Produkte ihrer Zerstörung (Endotoxine) hier ebenfalls in Betracht kommen.

Es wurde daher eine andere Versuchsreihe mit derselben Versuchsanordnung wie die vorangegangene angestellt, jedoch mit dem Unterschiede, daß die Faeces durch eine Berkefeldkerze vorher filtriert wurden.

Diese Versuche ergaben, daß durch das Filtrieren die Faeces fast vollständig ihre spezifischen Cholera-Antigene verloren haben. Verhältnismäßig große Mengen des Filtrats (0,5 und 1,0 ccm) ergaben nur eine ganz geringe Komplementbindung.

Es ist bemerkenswert, daß normales Pferdeserum, welches in Mengen von 0,2 und 0,3 mit unfiltrierten Faeces eine Komplementbindung erzeugte, mit filtrierten Faeces gar keine komplementbindende Wirkung ausübte.

Die Resultate dieser Versuche gestatten den Schluß zu ziehen, daß beim Filtrieren die spezifischen Cholera-Antigene zurückgehalten werden; es ist möglich, daß die Spezifität der unfiltrierten Faeces ausschließlich an die Anwesenheit der Choleravibrionen gebunden ist.

Um die Virulenz des filtrierten Stuhles zu prüfen, wurden 5 ccm desselben einem Meerschweinchen intraperitoneal eingespritzt. Das Tier blieb völlig gesund.

Um die Bedeutung des Filtrierens des Cholerastuhles für das Komplementbindungsphänomen weiter aufzuklären, wurden Versuche mit einigen Choleraprodukten, welche wir, der Kürze halber, als Endotoxine bezeichnen werden, angestellt.

Es wurden folgende Produkte untersucht:

- 1) Endotoxine, die von mir gemeinsam mit Dr. Kandiba aus Cholerakulturen, die auf geronnenem Pferdeserum gezüchtet waren, hergestellt wurden;
- 2) Endotoxine von Prof. Kraus aus alten Bouillon-Kulturen;
- 3) Endotoxine aus 1-tägigen Bouillonkulturen. Die ersten zwei Endotoxine wurden aus 10—20-tägigen Kulturen angefertigt.

Bei den Versuchen zeigte sich ein Unterschied zwischen den alten und jungen Endotoxinen. Die ersteren behielten auch nach dem Filtrieren durch die Berkefeldkerze ihre spezifischen Cholera-Antigene fast in vollem Maße. Man konnte nur eine ganz geringe Verminderung feststellen. Dagegen verloren die eintägigen Endotoxine nach dem Filtrieren fast vollständig die Fähigkeit der Komplementbindung in Gegenwart von Choleraimmunserum.

Sollten weitere Untersuchungen unsere Beobachtung, daß die Cholerafaeces nach dem Filtrieren die Fähigkeit, Komplement zu binden, verlieren, bestätigen, so wären auch noch andere interessante Fragen über die Natur der alten Endotoxine zu entscheiden; zunächst, ob diese Endotoxine sich auch im menschlichen Organismus bei Cholera bilden; wenn sie in den Faeces nicht vorhanden sind, entstehen sie vielleicht in der Darmwand selbst? Es wäre auch die Möglichkeit zu erwägen, daß diese Endotoxine in vivo sich überhaupt nicht bilden und die Krankheitserscheinungen sowie der Tod durch andere, noch nicht bekannte giftige Substanzen hervorgerufen werden. Die Voraussetzung, daß in den Cholerafaeces die Choleravibrionen als Träger der spezifischen Antigene erscheinen, veranlaßte mich, einige Versuche mit eintägigen Agarkulturen dieser Mikroorganismen anzustellen, um ihre Fähigkeit, das Komplement in Gegenwart eines Choleraimmunserums zu binden, festzustellen.

Zu diesen Versuchen wurden Aufschwemmungen der Vibrionen benützt, die in der Weise hergestellt wurden, daß eine eintägige Agarkultur (aus schräggefüllten Röhrchen) in 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung verteilt wurde. Für jeden Versuch wurde 1 ccm dieser Aufschwemmung benutzt. Diese Versuche ergaben, daß schon ganz geringe Serummengen (0,001 ccm) genügten um bei dieser Dosis der Vibrionen-Aufschwemmung das ganze Komplement (0,1 ccm) zu binden.

Ferner wurde eine Versuchsreihe mit Vibrionen-Aufschwemmungen, die durch die Berkefeldkerze filtriert wurden, angestellt. Bei diesen Versuchen wurden die eintägigen Agarkulturen nur in 10 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Es zeigte sich, daß das Filtrat der Cholerakulturen

ebenso wie die filtrierten Cholerafaeces gar keine spezifische Cholera-Antigene enthielten.

Kontrollversuche über die komplementbindenden Eigenschaften anderer Mikroorganismen in Gegenwart eines Choleraimmunserums — es wurden Typhusbacillen, *Staphylococcus aureus* und *Vibrio Metschnikoff* geprüft — ergaben ein negatives Resultat, d. h. bei derselben Versuchsanordnung vermochten diese Mikroorganismen mit verschiedenen Mengen des Choleraimmunserums Komplement nicht zu binden.

Es wurden außer den erwähnten Faeces noch 3 Stühle untersucht, die von 3 Kindern unserer Cholera Patienten stammten. Die Kinder erkrankten an Darmstörungen verschiedenen Grades. Bei der bakteriologischen Untersuchung waren in sämtlichen Stühlen Cholera vibrien festgestellt. Die Stühle waren jedoch keine typischen Choleraentleerungen. Nur einer von ihnen war flüssig (No. 1), die anderen zwei (No. 2 u. 3) waren dickbreiig. Die Faeces wurden zur Anstellung der Versuche dreifach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die vorläufige Untersuchung dieser Stühle ergab folgendes: No. 1 wirkte stark hämolytisch, während No. 2 und 3 keine hämolytische Wirkung zeigten; andererseits besaß der Stuhl No. 3 starke bindende Eigenschaften. In Dosen 0,3—0,5 und 1,0 band er allein 0,1 Komplement. Zu den Versuchen wurden verschiedene Mengen dieser 3 Faeces angewandt. In sämtlichen Proben zeigte sich bei Verwendung kleiner Mengen des Choleraimmunserums eine geringe Hemmung der Hämolyse, d. h. schwach ausgesprochene Komplementbindung; mit normalem Pferdeserum ist keine Hemmung der Hämolyse eingetreten.

Die nicht scharf ausgesprochenen Resultate der Komplementbindungsversuche in diesen 3 Fällen sind höchst wahrscheinlich durch den geringen Gehalt der Stühle an spezifischen Cholera-Antigenen und durch reichliche Beimischung anderer Faecesbestandteile bedingt.

Kontrollversuche mit vier normalen flüssigen Stühlen ergaben bei analoger Versuchsanordnung negative Resultate.

Nachdem diese Versuche schon abgeschlossen waren, wurden uns aus einem Semstwo-Krankenhaus Faeces zur

Untersuchung eingesandt, die nach ihren makroskopischen Eigenschaften den Choleraentleerungen sehr glichen.

Es wurden sofort Komplementbindungsversuche nach Bordet-Gengou mit einer großen Zahl von Kontrollen angestellt. Eine Komplementbindung in Gegenwart von Choleraimmunserum kam nicht zustande, und wir konnten schon nach 4 Stunden feststellen, daß in den übersandten Faeces keine spezifischen Cholera-Antigene vorhanden waren. Die bakteriologische Untersuchung bestätigte diesen Befund: es konnten in den Faeces Cholera-vibrionen nicht nachgewiesen werden.

#### Zusammenfassung.

1) Die Cholerafaeces enthalten spezifische Cholera-Antigene, die nach der Methode von Bordet-Gengou, d. h. durch Komplementbindung in Gegenwart eines Choleraimmunserums nachgewiesen werden können.

2) Beim Filtrieren der Cholerafaeces durch eine Berkefeldkerze werden die spezifischen Antigene im Filter zurückgehalten, so daß im Filtrate die Antigene nicht mehr nach Bordet-Gengou nachweisbar sind.

3) Frische eintägige Agar- und Bouillonkulturen von Cholera-vibrionen, sowie alte (10—20-tägige) Kulturen dieser Mikroorganismen auf erstarrtem Pferdeserum und Bouillon enthalten spezifische Cholera-Antigene.

4) Beim Filtrieren durch die Berkefeldkerze verlieren frische Bouillonkulturen sowie Aufschwemmungen aus frischen Agarkulturen ihre Antigene; alte Kulturen dagegen behalten auch nach dem Filtrieren ihre Antigene.

5) Die letzten zwei Thesen gestatten die Annahme, daß die Cholerafaeces, die beim Filtrieren ihrer Antigene verlustig werden, höchst wahrscheinlich keine Substanzen (Endotoxine) enthalten, die in den alten Kulturen von Cholera-vibrionen vorhanden sind.

6) Die Spezifität der Cholerafaeces als Antigene wird wahrscheinlich durch die Anwesenheit von Cholera-vibrionen bedingt.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der experimentellen Abteilung des Instituts für Hygiene  
und experimentelle Therapie zu Marburg.]

### **Zur Bestimmung sehr kleiner Mengen Diphtherie- antitoxins.**

Von Professor Dr. Paul H. Römer und Dr. Th. Sames.

(Eingegangen bei der Redaktion am 23. Juli 1909.)

In einer in dieser Zeitschrift veröffentlichten Arbeit<sup>1)</sup> wurde gezeigt, daß es durch intrakutane Injektion von Diphtheriegift gelingt, minimale Mengen dieses Giftes nachzuweisen. Bei zwei untersuchten Giften gelang der Nachweis von etwa  $\frac{1}{500}$  der subkutan tödlichen Minimaldosis.

Aus dieser Feststellung ergab sich von selbst der Versuch, die intrakutane Injektionsmethode auch zum Nachweis sehr kleiner Mengen Diphtherieantitoxins anzuwenden.

Bereits früher ist von Marx<sup>2)</sup> eine Methode zur Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxins beschrieben worden. Marx benutzte als Indikator für die Antitoxinwirkung nicht die bei der üblichen Serumprüfung zu Grunde gelegte Verhinderung der akut tödlichen Diphtheriegiftwirkung, sondern die Neutralisierung des ödemmachenden Effektes des Diphtheriegiftes. Ein deutlich erkennbares subkutan Oedem wird nach Marx von  $\frac{1}{7}$  bis  $\frac{1}{12}$ , nach unseren eigenen Erfahrungen gelegentlich noch von  $\frac{1}{15}$  bis  $\frac{1}{30}$  der tödlichen Minimaldosis erzeugt.

Unter Benutzung einer tunlichst geringen, aber noch sicher ödemmachenden Dosis des Diphtheriegiftes gelang es Marx auf diese Weise  $\frac{1}{1200}$  IE. (= Immunisierungseinheit) nachzuweisen, wenn der Glattwert für die Beurteilung zugrunde gelegt wurde. Da die größte Serummengenge, welche bei der Marxschen Versuchsanordnung zweckmäßigerweise injiziert werden darf, 0,2 ccm beträgt, so wäre ein Serum, das in

1) Römer, Ueber den Nachweis sehr kleiner Mengen des Diphtheriegiftes. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, Heft 2.

2) Marx, Die Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxins. Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 36.

1 ccm  $\frac{1}{240}$  IE. enthält, nach Marx noch als diphtherieantitoxinhaltig erkennbar. Wie Marx mit Recht hervorhebt, hängt die Möglichkeit des Nachweises kleiner Antitoxinmengen sehr von der Art des Giftes ab. Am besten eignen sich sogenannte „Gleichgifte“, bei denen zwischen direktem und indirektem Giftwert keine Differenzen bestehen.

Diese Marxsche Prüfungsmethode hat sich inzwischen für experimentell-klinische Untersuchungen sehr bewährt. Sie hat — abgesehen von ihrer quantitativen Leistungsfähigkeit — den Vorzug, daß an je einem Meerschweinchen gleichzeitig zwei Prüfungen vorgenommen werden können, was für klinische Laboratorien oder Institute mit beschränkten Mitteln rein ökonomisch von Bedeutung ist; sie hat aber noch den Nachteil, daß sie eine Tötung der Versuchstiere verlangt, da nur auf Grund des Obduktionsbefundes die Entscheidung gefällt werden kann.

Wir haben die intrakutane Giftinjektionsmethode zur Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxins verwertet und gefunden, daß sie einmal uns noch kleinere Mengen Diphtherieantitoxins anzuzeigen vermag als die Marxsche Methode, sowie daß sie es ermöglicht, an einem einzigen Tiere gleichzeitig 4 Prüfungen auszuführen, ohne eine Tötung der geprüften Tiere zu erfordern.

Wir haben uns zunächst in einer Reihe von Vorversuchen davon überzeugt, daß es keinen Einfluß auf das Ergebnis hat, ob man je eine Dosis einem Meerschweinchen injiziert oder 4 Dosen ein und demselben Tiere, vorausgesetzt, daß die Injektionsstellen weit genug voneinander liegen. Des näheren verweisen wir auf die nachfolgenden Versuchsreihen.

Wir benutzten zum Versuch das Diphtheriegift Ballon 7, welches in der vorigen Mitteilung bereits beschrieben wurde. Es ist durch folgende Werte charakterisiert:

1 ccm = 53000 + M (d. h. 1 ccm enthält bei subkutaner Injektion die tödliche Dosis für 53000 g Meerschweinchen),  
 1 ccm = 215000 + m (d. h. 0,116 ccm ergibt in vitro gemischt mit 1 I.E. und subkutan injiziert = L<sup>+</sup>),  
 0,00001 ccm = intrakutan wirksame Minimaldosis.

In den nachfolgenden Versuchen injizierten wir die Mischungen von Toxin und Antitoxin stets in 0,1 ccm Ge-

samtflüssigkeit. Wir gingen so vor, daß die entsprechende Giftmenge in 0,05 ccm und die entsprechende Antitoxinmenge ebenfalls in 0,05 ccm enthalten war. Von den Gift- und Antitoxinverdünnungen wurden dann gleiche Teile — in der Regel 1 ccm Giftverdünnung + 1 ccm Antitoxinverdünnung — gemischt. Die Mischungen blieben hierauf 2 Stunden bei 37°, dann noch 22 Stunden bei Eisschrantemperatur und wurden nach abermaligem viertelstündigen Stehen bei 37° injiziert.

Wir wählten diese Versuchsanordnung auf Grund des Vorganges von Marx, der Toxin-Antitoxinmischungen ebenfalls solange in Kontakt ließ, da er mit der Möglichkeit einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Toxin und Antitoxin bei der großen Verdünnung der entsprechenden Lösungen rechnete. Wir lassen es dahingestellt, ob dieser Grund die von Marx gewählte Versuchsanordnung rechtfertigt, haben uns aber, um sicher zu gehen, derselben auch angeschlossen.

Die zum Versuch benutzten Meerschweinchen waren frische, bisher noch zu keinerlei Versuchszwecken verwandte Tiere. Zur Injektion benutzten wir die seitlichen Brust- und Bauchpartien. Vor Vornahme der Injektion wird zunächst eine Depilierung in der Weise vorgenommen, daß die Tiere mit einer gebogenen Schere ziemlich kurz geschoren werden, dann Calciumhydrosulfid in mäßig dicker Schicht aufgetragen und nach einem Kontakt von 2—3 Minuten mit der Haut wieder abgewaschen wird, wobei eine gute Enthaarung der bestrichenen Körperpartie eintritt. Vor längerem Kontakt der Haut mit Calciumhydrosulfid muß gewarnt werden, da sonst die Beurteilung der Reaktion sehr störende Ekzeme durch die Calciumhydrosulfidwirkung entstehen können. Die Injektion selbst wurde mit Hilfe einer mit einer feinen Kanüle armierten Pravazspritze ausgeführt.

In der ersten Versuchsreihe bestimmten wir das für das 20-fache Multiplum der intrakutan wirksamen Minimaldosis des Diphtheriegiftes Ballon 7 nötige Antitoxinquantum. Wir bestimmten also diejenige Antitoxinmenge, welche imstande ist, 0,0002 ccm des Diphtheriegiftes Ballon 7 so weit zu neutralisieren, daß eben nur noch eine Andeutung von intrakutaner Giftwirkung (Spur Hautnekrose) eintrat.

Tabelle I.

Meer- schw. No.	Ge- wicht g	0,0002 D.G. + ? IE.	Folgen der Injektion nach:				
			24 <sup>a</sup>	2 × 24 <sup>a</sup>	3 × 24 <sup>a</sup>	4 × 24 <sup>a</sup>	8 × 24 <sup>a</sup>
8101	260	0 IE.	Verfärbung und Schwellung	Schwellung, beginnende Nekrose	starke Nekrose	starke Nekrose	starke Nekrose
8097	220	$\frac{1}{500}$ "	0	0	0	0	0
8102	270	$\frac{1}{720}$ "	0	0	0	0	0
8123	250	$\frac{1}{1000}$ "	0	0	0	0	0
8120	200	$\frac{1}{1500}$ "	0	0	0	0	0
8122	270	$\frac{1}{2000}$ "	0	Spur Schwellung	Spur Nekrose	Spur Nekrose	Spur Haar- ausfall
8096	280	$\frac{1}{5000}$ "	Quaddel	Quaddel mit Nekrose	Nekrose	Nekrose	Nekrose
8091	280	$\frac{1}{7500}$ "	"	dgl.	"	"	"
8068	250	$\frac{1}{10000}$ "	"	dgl.	"	"	"
8107	245	$\frac{1}{15000}$ "	"	dgl.	"	"	"
8063	265	$\frac{1}{20000}$ "	"	dgl.	"	"	"
8125	240	0 "	"	dgl.	"	"	"

Es vermochte also  $\frac{1}{2000}$  IE. die Giftdosis von 0,0002 ccm soweit zu neutralisieren, daß eben nur noch eine Spur Lokal-  
effekt erkennbar war. Gleichzeitig haben wir die gleichen  
Mischungen von Toxin und Antitoxin noch den in Tabelle II  
aufgeführten Meerschweinchen injiziert, hier aber dem einzelnen  
Tier je 3 Injektionen verabfolgt.

Tabelle II.

Meer- schw. No.	Ge- wicht g	0,0002 ccm D.G. + ? IE.	Folgen der Injektion nach:				
			24 <sup>a</sup>	2 × 24 <sup>a</sup>	3 × 24 <sup>a</sup>	4 × 24 <sup>a</sup>	8 × 24 <sup>a</sup>
8116	170	$\frac{1}{500}$ IE. l. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{720}$ " l. h.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{1000}$ " r. v.	0	0	0	0	0
8087	240	$\frac{1}{1500}$ " l. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{2000}$ " l. h.	geringe Schwellung	Spur Schwellung u. Verfärb.	Spur Nekrose	Spur Nekrose	Spur Ent- haarung
		0 " r. v.	starke Quaddel	Quaddel mit Nekrose	starke Nekrose	starke Nekrose	starke Nekrose
8110	250	$\frac{1}{5000}$ " l. v.	Quaddel	Quaddel mit begin- nend. Nekr.	Nekrose	Nekrose	Nekrose
		$\frac{1}{7500}$ " l. h.	"	dgl.	"	"	"
		$\frac{1}{10000}$ " r. v.	"	dgl.	"	"	"
8109	220	$\frac{1}{15000}$ " l. v.	"	dgl.	"	"	"
		$\frac{1}{20000}$ " l. h.	"	dgl.	"	"	"
		0 " r. v.	"	dgl.	"	"	"



Die quantitative Prüfung an den in Tabelle II aufgeführten 4 Meerschweinchen ergibt also das gleiche Ergebnis, wie die Einzelprüfung an den in Tabelle I aufgeführten Tieren, ein Beweis, daß man also unter den genannten Bedingungen an einem der Tiere mehrere Prüfungen ausführen kann, ohne daß die Genauigkeit des Ergebnisses leidet.

Wir kommen auf Grund dieser Versuche zu dem Ergebnis, daß  $\frac{1}{2000}$  IE. die Giftdosis von 0,0002 ccm D.G. Ballon 7, welche ohne Antitoxin zu einer starken Nekrose führt, soweit zu neutralisieren vermag, daß nur noch ein schwacher, eben erkennbarer Lokaleffekt erzielt wird.

Die verwandte Dosis von 0,0002 ccm stellt aber noch das 20-fache der sicher wirksamen Minimaldosis vor. Wir haben daher versucht, die zur Neutralisierung der Dosis von 0,00001 ccm D.G. Ballon 7 nötige Antitoxinmenge zu ermitteln.

Tabelle III.

Meer- schw. No.	Ge- schw. wicht g	0,00001 ccm D.G. + ? IE.	Folgen der Injektion nach:				
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	4 × 24 <sup>h</sup>	8 × 24 <sup>h</sup>
8005	270	0 IE. l. v.	Rötung	Rötung u. Schwellung	kleine Nekrose	Nekrose	Narbe
		$\frac{1}{100000}$ „ l. h.	„	dgl.	dgl.	„	„
		$\frac{1}{100000}$ „ r. v.	„	dgl.	Spur Nekrose	Spur Nekrose	Spur Ent- haarung
8114	200	$\frac{1}{80000}$ „ r. h.	„	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
		$\frac{1}{80000}$ „ l. v.	0	Spur Ver- färbung	Ver- färbung	Spur Nekrose	Spur Ent- haarung
		$\frac{1}{50000}$ „ l. h.	0	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
		$\frac{1}{40000}$ „ r. v.	0	0	Spur Ver- färbung	dgl.	dgl.
8111	230	$\frac{1}{80000}$ „ r. h.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{20000}$ „ l. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{15000}$ „ l. h.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{10000}$ „ r. v.	0	0	0	0	0
8117	220	$\frac{1}{7500}$ „ l. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{5000}$ „ l. h.	0	0	0	0	0
		0 „ r. v.	Rötung	Rötung u. Schwellung	kleine Nekrose	Nekrose	Narbe

Die Beeinflussung des lokalen Gifteffektes macht sich bereits bei  $\frac{1}{100000}$  IE. etwas bemerkbar;  $\frac{1}{40000}$  IE. neutralisiert jedenfalls die verwandte Giftdosis soweit, daß es nur noch zu

einer Andeutung von lokaler Giftwirkung kommt. Die Wiederholung der Prüfung der oben aufgeführten Toxin-Antitoxinmischungen an Einzeltieren, deren genaue Aufführung sich wohl erübrigen dürfte, führte zu genau dem gleichen Ergebnis, d. h. wir vermochten  $\frac{1}{40000}$  IE. mit Sicherheit nachzuweisen. Ein Vergleich mit dem Ergebnis der in Tabelle I und Tabelle II aufgeführten Versuche ergibt übrigens, daß die Neutralisierung des Diphtheriegiftes genau nach dem Gesetz der multiplen Proportion unter den genannten Bedingungen erfolgte:

0,0002 ccm des Diphtheriegiftes brauchen zur Neutralisierung  $\frac{1}{2000}$  IE. und  
 0,00001 " " " " " "  $\frac{1}{40000}$  "

Wir haben sodann noch an einem weiteren Gifte festzustellen versucht, welche Mindestmenge von Antitoxin wir nachweisen können. Wir benutzten dazu das Diphtheriegift vom 6. April 1909, das in der früheren Mitteilung bereits beschrieben wurde und durch folgende Werte gekennzeichnet ist: 1 ccm = 22000 + M (d. h. tödliche Dosis für 22000 g Meer-schweinchen), 0,00002 ccm = intrakutan wirksame Minimaldosis.

Tabelle IV.

Meer-schw. No.	Gewicht g	0,00002 ccm D.G. + ? IE.	Folgen der Injektion nach:				
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	4 × 24 <sup>h</sup>	8 × 24 <sup>h</sup>
8130	250	0 IE. l. v.	Verfärbung	Rötung und Schwellung	geringe Nekrose	geringe Nekrose	glatt
		$\frac{1}{100000}$ " l. h.	0	Rötung	Spur Nekrose	Spur Nekrose	"
		$\frac{1}{80000}$ " r. v.	0	Spur Rötung	dgl.	dgl.	"
		$\frac{1}{40000}$ " r. h.	0	0	0	0	0
8132	200	$\frac{1}{20000}$ " l. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{20000}$ " l. h.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{10000}$ " r. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{5000}$ " r. h.	0	0	0	0	0

Mit dem Diphtheriegift vom 6. April 1909 gelang es also eine mindestens ebenso kleine Menge Antitoxin nachzuweisen wie mit dem Diphtheriegift Ballon 7. Man wird vermutlich mit frischen Giften mit höherem direkten Giftwert noch beträchtlich kleinere Mengen Diphtherieantitoxin nachweisen können. Aber schon unter Berücksichtigung dessen, was die intrakutane Injektionsmethode mit Hilfe der von uns benutzten Gifte leistet, kommt man zu enormen Verdünnungen

des Serums, die noch als antitoxinhaltig erkannt werden können. Eine kurze Berechnung möge das illustrieren: Unsere wirksamsten Diphtheriesera enthalten pro 1 ccm 2000 IE. Da man mit Hilfe unserer intrakutanen Injektionsmethode noch mit Sicherheit  $\frac{1}{40000}$  IE. nachweisen kann, gelingt also noch der Nachweis von  $\frac{1}{2000 \times 40000}$  ccm des Serums =  $\frac{1}{80000000}$  ccm des Serums.

Bekanntlich sind die Antitoxine nach allem was wir bisher wissen, unzertrennlich mit dem Eiweiß des Blutserums verknüpft und wir können deshalb den Antitoxinnachweis zugleich als Eiweißnachweis auffassen. In diesem Sinne sei uns eine kleine Zusammenstellung der quantitativen Leistungsfähigkeit der uns bisher bekannten biologischen Methoden zum Eiweißnachweis erlaubt.

Chemisch gelingt es höchstens noch eine Eiweißlösung 1:1000 als solche nachzuweisen. Mit Hilfe der Präzipitinmethode können wir durch die wirksamsten Antisera eine Serumverdünnung 1:50 000 nachweisen, was einer Eiweißlösung von etwa 1:500 000 entsprechen würde. Die spezifische Ueberempfindlichkeitsreaktion vermag gelegentlich  $\frac{1}{1000000}$  selbst bis zu  $\frac{1}{10000000}$  ccm Serum nachzuweisen, was wiederum einer ca. 10-fach geringeren Eiweißmenge entsprechen würde. Die Komplementbindungsreaktion leistet in der Regel quantitativ etwas mehr als die Präzipitinmethode, indem sie Serum-mengen von 1:100 000 bis 1:1 000 000 nachweist<sup>1)</sup>; sie kann aber, wie Friedberger<sup>2)</sup> gezeigt hat, gelegentlich Serumverdünnungen von 1:1 Milliarde noch erkennbar machen. Die von uns beschriebene intrakutane Injektion von Mischungen des Diphtherieantitoxins mit minimalen Diphtheriegiftmengen vermag noch mit Sicherheit  $\frac{1}{80000000}$  ccm antitoxischen Serums, d. h.  $\frac{1}{800000000}$  g antitoxischen Eiweißes nachzuweisen. Für den Nachweis tetanusantitoxinhaltigen Serumeiweißes liegen in quantitativer Hinsicht die Verhältnisse bei der subkutanen

1) Neisser und Sachs, Ein Verfahren zum forensischen Nachweis der Herkunft des Blutes. Berl. klin. Wochenschr., 1905, No. 44.

2) Friedberger, Zur forensischen Eiweißdifferenzierung auf Grund der hämolytischen Methode mittels Komplementablenkung nebst Bemerkungen über die Bedeutung des Präzipitates für dieses Phänomen. Deutsche med. Wochenschr., 1906, No. 15.

Prüfung von Mäusen mit krankmachenden Dosen frischer hochwirksamer Tetanusgifte und bei Verwendung hochwertigen (10-fachen) Tetanusserums ähnlich. Kurz zusammengestellt, ergäbe sich hinsichtlich der quantitativen Leistungsfähigkeit für die verschiedenen Methoden des Eiweißnachweises folgende Reihenfolge:

Die chemische Methode weist Eiweiß bis zur Verdünnung . . . . .	1:1000	nach.
Die Präzipitinmethode weist Eiweiß bis zur Verdünnung . . . . .	1:500 000	„
Die spezifische Ueberempfindlichkeits-Reaktion weist Eiweiß bis zur Verdünnung . . . . .	1:10 000 000	„
Die Methode des Antitoxinnachweises weist Eiweiß bis zur Verdünnung . . . . .	1:800 000 000	„

Die Komplementbindungsmethode weist Eiweiß in der Regel bis zur Verdünnung 1:10 000 000 nach, kann aber gelegentlich bis zu 1:10 Milliarden noch den spezifischen Eiweißnachweis führen.

#### Zusammenfassung.

1) Durch Mischung von Diphtherieantitoxin mit minimalen, eben noch wirksamen Diphtheriegift Dosen kann bei intrakutaner Injektion der Toxin-Antitoxinmischungen noch  $\frac{1}{40000}$  IE. mit Sicherheit nachgewiesen werden.

2) Je frischer das benutzte Diphtheriegift und je geringer die Differenz zwischen direktem und indirektem Giftwert ist, um so geringere Mengen Antitoxin sind durch die intrakutane Injektion von Toxin-Antitoxinmischungen nachweisbar.

3) Eine Berechnung der quantitativen Leistungsfähigkeit der verschiedenen biologischen Methoden als Mittel des Eiweißnachweises ergibt folgende Reihenfolge: Präzipitinmethode, Komplementbindungsmethode, spezifische Ueberempfindlichkeits-Reaktion, Antitoxinmethode, wobei die erstgenannte quantitativ am wenigsten, die letztgenannte am meisten leistet. Die Komplementbindungsmethode leistet in der Regel etwa dasselbe wie die spezifische Ueberempfindlichkeits-Reaktion, kann aber gelegentlich (Friedberger) die Leistungsfähigkeit sogar der Antitoxinmethode noch weit übertreffen. Die Antitoxinmethode eignet sich natürlich ausschließlich zum Nachweis antitoxischen Eiweißes.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

**Ueber das Lyssavirus „Fermi“, über Schutzimpfungs-  
versuche mit normaler Nervensubstanz und über Wir-  
kungen des rabiziden Serums.**

Von Prof. **R. Kraus** und Prof. **Y. Fukuhara** (Osaka).

(Eingegangen bei der Redaktion am 27. Juli 1909.)

**I. Ueber das Lyssavirus Fermi.**

In jüngster Zeit hat Fermi gezeigt, daß Lyssavirus fixe und auch Straßenvirus von der Subcutis aus konstant in hohen Verdünnungen infektiös zu wirken vermag. Allerdings wirkt nicht jedes Virus in dieser Weise, sondern nur Virus fixe einzelner Institute fand Fermi wirksam. Am wirksamsten erwies sich Virus fixe Sassari und Palermo, weniger sicher von der Subcutis aus wirkte Virus der Pasteur-Institute in Rom, Turin, Florenz, und als unwirksam erwies sich das Virus der Institute Bologna und Mailand. Ob auch das Straßenvirus in diesen Städten ein solches Verhalten aufweist, ist offenbar nicht untersucht worden. Das Straßenvirus, welches Fermi in seinen Arbeiten benutzt hatte, war ebenfalls von der Subcutis wirksam. Als Versuchstiere erwiesen sich Muriden für die subkutane Infektion am besten geeignet, und es gelang Fermi noch mit Verdünnungen von 1:30—60 000 bei diesen Tieren Lyssa zu erzeugen.

Die Tatsache an und für sich, daß mittels subkutaner Infektion konstant Lyssa erzeugt werden kann, weiter das von Fermi nachgewiesene verschiedene Verhalten des Virus einzelner Institute veranlaßte uns, die Frage der subkutanen Infektiosität des Lyssavirus zu studieren.

Zunächst haben wir mit dem Virus Fermi, welches uns Herr Prof. Fermi freundlichst überlassen hat, Versuche angestellt, die im folgenden mitgeteilt werden.

# 1. Versuche mit Virus Fermi an weißen Mäusen (subkutane Infektion).

18. V.	Virus aus Glyzerin	0,5 ccm	1:5	lebt
	" " "	0,5 "	1:10	25. Lyssa, 26. †
	" " "	0,5 "	1:100	lebt
2. VI.	Virus v. Kaninchengehirn	0,5 "	1:10	7. Lyssa, †
	" " "	0,5 "	1:50	8. " 9. †
	" " "	0,5 "	1:100	9. " †
22. VI.	Virus v. Kaninchengehirn	0,5 "	1:10	30. †
	" " "	0,5 "	1:50	lebt
	" " "	0,5 "	1:100	2. †
29. VI.	Virus v. Kaninchengehirn	0,5 "	1:10	} 4. Lyssa, 5. †
	" " "	0,5 "	1:50	
8. VIII.	dgl. filtriert durch Papier	0,5 "	1:10	15. Lyssa, †
	" " " "	0,5 "	1:50	13. " 15. †
	" " " "	0,5 "	1:50	lebt
	" " " "	0,5 "	1:100	14. Lyssa, 16. †
	" " " "	0,5 "	1:100	16. " 17. †
	" " " "	0,3 "	1:10	} leben
	" " " "	0,3 "	1:50	
	" " " "	0,3 "	1:100	
2. IX.	dgl. filtriert durch Papier	0,5 "	1:10	8. †
	" " " "	0,5 "	1:10	8. Lyssa, 9. †
	" " " "	0,5 "	1:50	6. †
	" " " "	0,5 "	1:50	9. †
	" " " "	0,5 "	1:100	lebt
	" " " "	0,5 "	1:100	9. Lyssa
10. IX.	dgl. filtriert durch Papier	0,5 "	1:10	18. Lyssa, 19. †
	" " " "	0,5 "	1:10	lebt
	" " " "	0,5 "	1:10	17. Lyssa, 18. †
	" " " "	0,5 "	1:10	lebt
	" " " "	0,5 "	1:50	"
	" " " "	0,5 "	1:50	17. †
	" " " "	0,5 "	1:50	22. Lyssa, †
	" " " "	0,5 "	1:50	18. " 19. †
	" " " "	0,5 "	1:100	17. " 18. †
	" " " "	0,5 "	1:100	17. †
	" " " "	0,5 "	1:100	18. Lyssa, 19. †
	" " " "	0,5 "	1:100	18. †
23. XI.	dgl. filtriert durch Papier	0,5 "	1:50	30. †
	" " " "	0,5 "	1:50	30. †
	" " " "	0,5 "	1:50	30. †
	" " " "	0,5 "	1:100	lebt
	" " " "	0,5 "	1:100	28. †
	" " " "	0,5 "	1:100	27. †
	" " " "	0,5 "	1:500	30. †
	" " " "	0,5 "	1:500	lebt
	" " " "	0,5 "	1:500	"
	" " " "	0,5 "	1:1000	"
	" " " "	0,5 "	1:1000	28. Lyssa, 29. †
	" " " "	0,5 "	1:1000	lebt
21. XII.	dgl. filtriert durch Papier	0,5 "	1:10	lebt
	" " " "	0,5 "	1:10	27. †
	" " " "	0,5 "	1:10	25. Lyssa, 26. †
	" " " "	0,5 "	1:10	25. †
	" " " "	0,5 "	1:50	26. †
	" " " "	0,5 "	1:50	28. Lyssa, 30. †
	" " " "	0,5 "	1:50	2. I. †

21. XII.	Virus v. Kaninchengehirn	0,5 ccm	1:50	25. †
	filtriert durch Papier			
	dgl.	0,5	" 1:100	26. †
	"	0,5	" 1:100	24. †
	"	0,5	" 1:100	24. †
	"	0,5	" 1:100	27. Lyssa, 28. †
	"	0,5	" 1:500	30. " 31. †
	"	0,5	" 1:500	28. †
	"	0,5	" 1:500	27. Lyssa, 28. †
	"	0,5	" 1:1000	30. " 1. I. †
2. I.	Virus v. Kaninchengehirn	0,5	" 1:10	9. Lyssa, 10. †, davon
	filtriert durch Papier			K. 317 subd. Lyssa †
	dgl.	0,5	" 1:10	9. Lyssa, 10. †, davon
	"	0,5	" 1:10	K. 386 subd. Lyssa †
	"	0,5	" 1:50	9. †, davon K. 480 lebt
	"	0,5	" 1:50	lebt
	"	0,5	" 1:50	"
	"	0,5	" 1:50	"
	"	0,5	" 1:100	9. Lyssa, davon K. 84
	"			Lyssa
	"	0,5	" 1:100	lebt
	"	0,5	" 1:100	"
	"	0,5	" 1:500	"
	"	0,5	" 1:500	"
	"	0,5	" 1:500	8. †, davon K. 231 lebt
	"	0,5	" 1:1000	lebt
	"	0,5	" 1:1000	"
	"	0,5	" 1:1000	"
6. I.	Virus v. Kaninchengehirn	0,5	" 1:10	12. Lyssa, †, davon K.
	filtriert durch Papier			345 Lyssa
	dgl.	0,5	" 1:10	lebt
	"	0,5	" 1:10	12. Lyssa, †, davon K.
	"			412 Lyssa
	"	0,5	" 1:50	lebt
	"	0,5	" 1:50	"
	"	0,5	" 1:50	13. Lyssa, †
	"	0,5	" 1:100	lebt
	"	0,5	" 1:100	18. Lyssa, 19. †, davon
	"			K. 149 Lyssa
	"	0,5	" 1:100	12. †, davon K. 28 lebt
	"	0,5	" 1:500	lebt
	"	0,5	" 1:500	"
	"	0,5	" 1:500	"
	"	0,5	" 1:1000	"
	"	0,5	" 1:1000	"
	"	0,5	" 1:1000	"
26. I.	Virus Fermi II nicht	0,5	" 1:10 •	1. Lyssa, 2. †
	filtriert durch Papier			
	dgl.	0,5	" 1:10	3. " 2. †
	"	0,5	" 1:10	lebt
	"	0,5	" 1:50	1. †, davon Kan. Lyssa
	"	0,5	" 1:50	31. †, davon K. 108 lebt
	"	0,5	" 1:50	2. Lyssa, 3 †
26. I.	dgl. filtriert durch Papier	0,5	" 1:10	lebt
	" " " "	0,5	" 1:10	3. †, davon K. 302 lebt
	" " " "	0,5	" 1:10	1. Lyssa, davon K. 300
	" " " "			Lyssa
	" " " "	0,5	" 1:50	3. Lyssa, 4. †
	" " " "	0,5	" 1:50	lebt
	" " " "	0,5	" 1:50	5. †, davon K. 484 lebt

Wie die Versuche an weißen Mäusen lehren, gelingt es von der Subcutis aus mit Virus fixe Sassari Lyssa zu erzeugen und mit dem Gehirn der an Lyssa zugrunde gegangenen Mäuse Lyssa auf Kaninchen zu übertragen. Es gelingt aber nicht, konstant Lyssa hervorzurufen, wie es Fermi beschreibt. Nicht nur mit Verdünnungen des Virus 1:50 und 1:100 erhält man inkonstante Resultate, sondern sogar Verdünnungen 1:5 und 1:10 erzeugen nicht immer Lyssa<sup>1)</sup>. Die verschiedene Empfänglichkeit der Mäuserassen zur Erklärung heranzuziehen, dürfte nicht angehen, da unsere Mäuse ja empfänglich sind, jedoch, wie gesagt, äußerst inkonstant. Auch an eine Abschwächung des uns überlassenen Virus konnte gedacht werden, um die Inkonstanz erklären zu können. Deswegen haben wir in einer zweiten Versuchsreihe ein frisches Virus Fermi (II) uns ausgeben, mit welchem ebenfalls solche inkonstanten Resultate verzeichnet wurden.

## 2. Versuche mit Virus Fermi an weißen Ratten (subkutane Infektion).

18. V.	Virus aus Glyzerin	1,0 ccm	1:10	lebt
	" "	1,0 "	1:50	"
	" "	1,0 "	1:100	"
2. VI.	Virus von Kaninchenpassage	1,0 "	1:10	8. Lyssa, 9. †
	" "	1,0 "	1:50	8. " 9. †
	" "	1,0 "	1:100	lebt
16. VI.	Virus von Kaninchenpassage	1,0 "	1:10	23. Lyssa, †
	" "	1,0 "	1:50	lebt
	" "	1,0 "	1:100	"
22. VI.	dgl. durch Papierfilter	1,0 "	1:10	"
	" "	1,0 "	1:50	"
	" "	1,0 "	1:100	29. Lyssa, 30. †
16. XI.	dgl. durch Papierfilter	1,0 "	1:100	21. Lyssa
	" "	1,0 "	1:100	21. "
	" "	1,0 "	1:500	lebt
	" "	1,0 "	1:500	"
	" "	1,0 "	1:1000	"
	" "	1,0 "	1:1000	"

1) Oft gehen Mäuse ohne Lyssasymptome zugrunde, und es ist wahrscheinlich, daß sie nicht an Lyssa gestorben sind, da Verimpfungen des Gehirns dieser Tiere bei Kaninchen keine Lyssa hervorgerufen haben. Wir glauben vielmehr, daß in diesen hohen Konzentrationen normales Gehirn für Mäuse giftig ist.



Bei weißen Ratten ist die subkutane Infektion mit verdünntem Virus 1:10—100 ebenfalls wirksam, jedoch ebenso inkonstant wie bei Mäusen. Gleichlautende Resultate verzeichnen wir auch bei Kaninchen, bei welchen von der Subcutis aus mit Virus Fermi die Lyssainfektion gelingt, aber auch hier kann von einer absolut sicheren Wirkung nicht die Rede sein.

Dagegen hat die subkutane Infektion mit Virus fixe des Wiener Institutes (Inst. Pasteur Paris) und mit einem originären Virus fixe Wien bei Mäusen, Ratten und Kaninchen in den angewandten Verdünnungen 1:10—100 überhaupt keine Lyssa erzeugt. Gleiches Verhalten wie Virus Fermi zeigte noch Virus fixe Krakau, Kiew, Odessa, wogegen Virus fixe Bukarest ebenso von der Subcutis unwirksam war, wie Wiener Virus. (Eine stomachale Infektion mit Virus Fermi gelang uns weder bei Ratten noch bei Mäusen.)

### 3. Versuche mit Virus Fermi bei Gänsen und Hühnern.

Ein Versuch, den Fermi beschreibt, schien dafür zu sprechen, daß das Virus Fermi fixe bei Vögeln keine Lyssa zu erzeugen vermag. Durch frühere Untersuchungen (Kraus, Keller und Clairmont) ist ja nachgewiesen worden, daß Hühner und Gänse, mit Virus fixe subdural infiziert, Lyssa bekommen, die allerdings anders verläuft als bei Kaninchen.

Subdurale Inf. mit Vir. fixe Wien am	31. VII.	Gans	I	14. Lyssa, 15. †
" " " " " " "	31. VII.	"	II	14. " 24. †
" " " " " " "	31. VII.	Huhn	I	3. IX. Lyssa, 7. †
" " " " " " "	31. VII.	"	II	3. IX. " 7. †
Subkutan. Inf. mit Vir. fixe Wien am	31. VII.	Huhn	I	} leben
" " " " " " "	31. VII.	"	II	
" " " " " " "	31. VII.	"	III	
Virus Fermi konz. subdural am	31. VII.	Gans	I	} leben
" " " " " " "	31. VII.	"	II	
" " " " " " "	31. VII.	"	III	
Virus Fermi subkutan 1:10		Gans	I	} leben
" " " 1:10		"	II	
" " " 1:10		"	III	
" " " 1:10		"	IV	

Aus den vorangehenden Versuchen geht hervor, daß bei Gänsen und bei Hühnern (von 10 Hühnern ist bloß 1 Hahn erkrankt) die subdurale und subkutane Impfung mit Virus

Fermi mißlingt. Dadurch ist ein Unterschied gegenüber dem Virus fixe Wien ermittelt.

#### 4. Ueber subkutane Wirkung des Straßenvirus.

Ebenso wie das Virus fixe von Sassari konnten wir mit einem Straßenvirus, welches Fermi uns freundlichst überlassen hatte, Lyssa bei Mäusen durch subkutane Injektion erzeugen.

Versuch mit Straßenvirus Fermi (Gehirn von Kan. 123 am 20. I. corneal geimpft, 7. Lyssa, 8 †).

8. II.	Virus filtriert	0,5 ccm	1:10	lebt
	"	"	0,5	" 1:10
	"	"	0,5	" 1:10 24. Lyssa, 1. †
	"	"	0,5	" 1:50 lebt
	"	"	0,5	" 1:50 "
	"	"	0,5	" 1:50 "
23. II.	Virus filtriert	0,5	" 1:10	"
	"	"	0,5	" 1:10 †
	"	"	0,5	" 1:10 6. Lyssa, †.

Genau so wie Straßenvirus Sassari, verhielt sich bei weißen Mäusen Straßenvirus von einheimischen Hunden.

Straßenvirus I (Hundegehirn subdural Kaninchen am 21. I., 4. Lyssa, 5 †). Davon am:

5. II.	0,5 ccm filtriert	1:10	8. Lyssa, 9. †(?)
	0,5 "	"	1:10 lebt
	0,5 "	"	1:10 "
	0,5 "	"	1:50 "
	0,5 "	"	1:50 "
	0,5 "	"	1:50 "
12. II.	0,5 "	"	1:10 28. Lyssa, †
	0,5 "	"	1:10 28. " †
	0,5 "	"	1:10 1. †
	0,5 "	"	1:50 18. Lyssa, †
	0,5 "	"	1:50 6. " 14. †
	0,5 "	"	1:50 3. †

Straßenvirus II (Hundegehirn subdural Kaninchen 14. I., Lyssa am 28., †).

29. I.	0,5 ccm filtriert	1:10	24. Lyssa, †
	0,5 "	"	1:10 7. †, davon Kan. 96, 16. Lyssa, 17 †
	0,5 "	"	1:10 31. †
	0,5 "	"	1:50 lebt
	0,5 "	"	1:50 1. †, davon Kaninchen 292 lebt
	0,5 "	"	1:50 lebt
3. II.	0,5 "	"	1:10 16. Lyssa, 17 †
	0,5 "	"	1:10 22. †, davon Kaninchen 164 lebt
	0,5 "	"	1:10 lebt
	0,5 "	"	1:50 "
	0,5 "	"	1:50 "
	0,5 "	"	1:50 "

## Straßenvirus III.

16. II.	0,5 ccm	filtriert	1:10	lebt
	0,5	"	"	1:10 22. †
	0,5	"	"	1:10 18. †
	0,5	"	"	1:50 lebt

Diese Versuche wurden deswegen hier mitgeteilt, weil sie die Unzulänglichkeit der subkutanen Infektion mit Straßenvirus bei weißen Mäusen demonstrieren sollen.

Immerhin muß man auf Grund der vorangehenden Versuche mit Virus Fermi (fixe) und Virus fixe anderer Institute eine Verschiedenheit der Virusarten bezüglich ihrer Infektiosität annehmen. Es gibt Virusarten, welche von der Subcutis aus infektiös sind, andere, welchen diese Art der Infektiosität nicht zukommt. Gleichzeitig verhält sich das von der Subcutis aus infektiöse Virus bei Gänsen, Hühnern anders als das andere Virus, z. B. Virus fixe Wien. Letzteres erzeugt subdural bei gewissen Vögeln (Hühnern, Gänsen) Lyssa, dagegen wirkt ersteres weder von der Subcutis noch subdural infektiös.

Dieses verschiedene Verhalten des Lyssavirus (Fermi), welches sich auch in der Verkürzung des Inkubationsstadiums bei Kaninchen different erweist (am 5. Tage traten schon Erscheinungen auf), konnte zunächst in der Virulenz des Virus seine Ursache haben. Diesbezügliche vergleichende Untersuchungen mit Virus fixe Wien und Virus Fermi an Kaninchen, die subdural und corneal geimpft wurden, zeigten, daß die Virulenz beider Virusarten gleich ist. Verdünnungen 1:500 des filtrierten Virus erzeugen noch konstant Lyssa, darüber hinaus sind die Resultate ungewiß. In der Virulenz kann also der Unterschied nicht gelegen sein.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit konnte darin bestehen, daß das subkutan infektiöse Virus nicht auf dem Wege der Nerven ins Zentralnervensystem gelangt, wie man es seit den Versuchen von Vestea und Zagari allgemein für das Lyssavirus annimmt, sondern auf dem Wege der Lymph- und Blutbahn.

Zunächst wurde der Versuch gemacht, Blut von Kaninchen, die mit Virus Fermi subkutan infiziert waren und Lyssaerscheinungen hatten, subdural und subkutan auf Kaninchen zu verimpfen. In keinem dieser Versuche, selbst

nach subkutaner Injektion von 10 ccm Blut, gelang es, Lyssa zu erzeugen. In anderen Versuchen wurde Virus subkutan geimpft und Blut dieser Tiere nach verschiedener Zeit subdural Kaninchen injiziert.

1. Versuch. Kaninchen subkutan mit Virus Fermi 1:10 infiziert, nach 2 und 4 Stunden Blut

subdural Kaninchen	413	} leben
"          "	177	
subkutan          "          (4,0)	499	

2. Versuch. Kaninchen wurden mit Virus Fermi 1:10 subkutan infiziert; nach 24, 48 Stunden Blut von Kaninchen subkutan und subdural injiziert.

Blut nach 24 Stdn. subdural Kaninchen	117	} leben
"          24          "          subkutan          "	194	
"          48          "          subdural          "	149	

Der Ausfall dieser Versuche im Zusammenhang mit den folgenden spricht dafür, daß auf dem Wege der Blutbahn das Virus nicht ins Zentralnervensystem gelangt. Es ist anzunehmen, daß von der Subcutis Virus zwar in die Blutbahn gelangen kann, von da aber wieder sehr rasch verschwindet. Auch in den Organen (Leber, Niere, Milz) und im Blut subkutan infizierter Ratten läßt sich Lyssavirus Fermi nicht nachweisen.

Es ist danach wahrscheinlich gewesen, daß das von der Subcutis aus infektiös wirkende Virus auch auf dem Wege der Nerven ins Zentralnervensystem gelangt, wofür auch folgende Versuche den Beweis erbringen:

Versuch 1. Virus Fermi 1:10 subkutan Kaninchen am rechten Bein. Exzision des N. isch. nach 1—24 Stdn.

Kan.	6	nach 1 Stdn. N. isch. exzid. und subdural Kan.	418 leb
"	398	" 4 " " " " " " "	289 "
"	362	" 8 " " " " " " "	206 "
"	65 Lyssa †	" 12 " " " " " " "	176 "
"	35 " †	" 24 " " " " " " "	421 "

2. Versuch. Virus Fermi 1:10 subkutan nach 1—24 Stdn. N. isch. durchschnitten.

Kaninchen	380	nach 1 Stdn. N. isch. durchschnitten, lebt	
"	295	" 4 " " " " " "	"
"	378	" 8 " " " " " "	"
"	281	" 12 " " " " " "	"
"	322	" 24 " " " " " "	Lyssa

25\*

3. Versuch. Virus Fermi 1:10 subkutan, vorher wird der N. isch. desselben Beines durchschnitten.

Kaninchen	199	} leben
„	116	
„	16	

Danach bleiben sowohl Tiere am Leben, wenn der N. isch. des subkutan infizierten Beines vorher durchschnitten wurde als auch wenn die Durchschneidung 1—8 Stunden nach der Infektion erfolgt. Es dürfte demnach die Annahme gerechtfertigt sein, daß auch Virus Fermi von der Subcutis aus auf dem Wege der Nerven zum Zentralnervensystem gelangt. Warum ein Virus imstande ist, von der Subcutis zu den Nerven zu gelangen, das andere, auf diese Art injiziert, zumeist sich wirkungslos erweist, ist allerdings durch diese Versuche nicht geklärt worden.

In der Verschiedenheit der Virulenz und auch im Verhalten des Virus Fermi zu den Nerven konnte gegenüber dem von der Subcutis aus nicht infektiösen Virus kein Unterschied konstatiert werden. (Wichtig wäre, Straßenvirus in dieser Richtung systematisch zu untersuchen, da es möglich wäre, daß beim Straßenvirus bereits diese Eigenschaften sich nachweisen lassen könnten.)

Es war noch daran zu denken, daß Virus Fermi biologisch sich anders verhalten konnte als Virus fixe Wien. Es mußte untersucht werden, ob das Serum (gewonnen mit Virus fixe Wien), welches Virus fixe Wien in vitro noch in Verdünnungen 1:100 zerstört, in gleichen Verdünnungen Virus Fermi abtötet.

Versuch. Serum „Euklid“ (Pferd immunisiert mit Virus fixe) + Virus filtriert 1:100, in vitro stehen gelassen bei Zimmertemperatur, nach 24 Stdn. subdural Kaninchen.

0,1	Serum + 1,0	Virus fixe Wien	1:100,	davon subkutan	Kan. 184	lebt
0,05	„ + 1,0	„ „ „	1:100,	„ „ „	152	„
0,01	„ + 1,0	„ „ „	1:100,	„ „ „	427	„
0,005	„ + 1,0	„ „ „	1:100,	„ „ „	56	Lyssa +
0,001	„ + 1,0	„ „ „	1:100,	„ „ „	250	„ +
0,1	Serum + 1,0	Virus fixe Fermi	1:100,	davon subkutan	Kan. 143	lebt
0,05	„ + 1,0	„ „ „	1:100,	„ „ „	132	„
0,01	„ + 1,0	„ „ „	1:100,	„ „ „	432	„
0,005	„ + 1,0	„ „ „	1:100,	„ „ „	460	Lyssa +
0,001	„ + 1,0	„ „ „	1:100,	„ „ „	427	„ +

Dieser und noch andere Versuche, die hier anzuführen, nicht notwendig erscheint, lehren, daß das mit Virus fixe Wien gewonnene rabizide Serum in gleichen Verdünnungen Virus Fermi abtötet wie Virus Wien, so daß auch biologisch kein Unterschied nachweisbar ist.

Aber trotz dieser vielfachen selbst biologischen Uebereinstimmung müssen wir auf Grund der verschiedenen Aggressivität die Virusarten, welche von der Subcutis infektiös wirken, als nicht ganz identisch mit denjenigen ansehen, die subkutan wirkungslos sind. Andere Methoden, um die Ursachen dieser Verschiedenheiten aufzudecken als die hier in Anwendung gebrachten, besitzen wir nicht, so daß diese Frage als ungelöst zu betrachten ist.

## II. Vermag normale Nervensubstanz gegen Lyssavirus zu schützen?

Die von Babes zuerst aufgestellte Behauptung, daß normale Nervensubstanz Tiere gegen Lyssa zu schützen vermag, wurde von Aujeszky, Calabrese, Galavoette und Rimbaud bestritten. In letzter Zeit hat Fermi wiederum diese Frage experimentell studiert und sie im Sinne von Babes beantwortet.

Auf Grund ausgedehnter Versuchsreihen, gelangt Fermi zu der Annahme, daß die immunisierende Wirkung der Emulsion normaler Nervensubstanz nicht geringer ist als jene des Lyssagehirns. Wenn auch Fermi die Konsequenzen für die Praxis in bezug auf Schutzimpfung nicht gezogen hat, müßte man doch daran denken, das bisherige Verfahren nach Pasteur durch eine Immunisierung mit normaler Nervensubstanz zu ersetzen. Man würde auf diese Weise die kostspieligen Kaninchenpassagen ersparen, könnte überall die Emulsionen des Lammgehirns bereiten und auch das Schutzimpfungsverfahren würde wesentlich vereinfacht werden. Aus diesem Grunde und aus theoretischen Gründen haben wir die Versuche Fermis einer Ueberprüfung unterzogen. Es wurden Ratten (weiße) zuerst mit normaler Nervensubstanz vorbehandelt, 20 Tage nachher mit Virus Fermi fixe infiziert. Durch diese Versuchsanordnung glauben wir die

besten Bedingungen zugunsten Fermis gewahrt zu haben, indem vorbehandelte Tiere infiziert wurden. Statt des Straßenvirus benutzten wir zur Infektion Virus fixe Fermi deswegen, weil wir für ausgedehnte, durch längere Zeit fortzusetzende Versuche ein konstantes Virus vorgezogen haben.

1. Versuch. 4 Ratten werden vom 7. IX. bis 20. IX. täglich mit 2,0 karbolisiertem Lammgehirn (1:10) vorbehandelt (30 ccm); am 10. X. werden sie mit Virus Fermi (1:50) filtriert, subkutan infiziert. Davon erkrankte bloß 1 Ratte am 16. X. an Lyssa, † 18, die Kontrollratte bleibt, so wie die anderen 3 Ratten, gesund; am 20. X. erfolgt eine 2. Infektion mit Virus Fermi (1:10) und am 26. X. zeigen alle Ratten Lyssaerscheinungen und gehen zugrunde.

2. Versuch. 9 Ratten werden vom 22. IX. bis 11. X. mit 2,0 ccm karbolisiertem Lammgehirn (1:10) vorbehandelt, nach 20 Tagen werden sie mit Virus Fermi 1:10 und 1:50 subkutan infiziert. Von den mit Virus Fermi (1:10) infizierten Ratten bekommen 4 nach 6 und 8 Tagen Lyssa, sowie ein Kontrolltier, eine Ratte geht am 16. Tag ohne Lyssa zugrunde, die zweite Kontrollratte (1:50) überlebt.

Von den mit Virus Fermi (1:50) infizierten Ratten erkrankten alle 4 an Lyssa.

Nachdem uns diese Versuche mißlungen sind, haben wir mit karbolisiertem Lyssagehirn von Kaninchen, ebenso Ratten zu immunisieren versucht, wie mit normalem Lammgehirn, so wie es auch Fermi getan hat. Die Versuche zeigen, daß auch mit karbolisiertem Lyssagehirn eine Immunisierung nicht gelingt.

1. Versuch. 4 Ratten werden vom 3. IX. bis 17. IX. mit 2,0 karbolisiertem Virus fixe (1 Proz.) 1:10 täglich injiziert, so wie die Angaben Fermis lauten. Am 10. X. werden sie mit Virus Fermi 1:100 subkutan infiziert. Alle Ratten zeigen am 20. X. keine Erscheinungen, nur die Kontrollratte hat Lyssa. Am 20. X. wird zum zweitenmal mit Virus Fermi nicht filtriert (1:100) subkutan infiziert; am 27. X. zeigen 2 Ratten Lyssaerscheinungen, 2 überleben.

2. Versuch. 9 Ratten werden mit Virus fixe (1 Proz. karbolisiert) 1:10 vom 22. IX. bis 11. X. vorbehandelt; am 31. X. werden sie mit Virus Fermi 1:10 und 1:50 infiziert. Von den mit 1:10 infizierten hat 1 Ratte am 9. XI. Lyssa und auch die Kontrollratte. Von den mit 1:50 infizierten Ratten hat keine am 16. Tage nach der Infektion Lyssa. Am 15. Tage nach der ersten Infektion wird zum zweitenmal mit Virus Fermi 1:10 infiziert. Von den ersteren Ratten erkrankt 1 an Lyssa, 2 überleben, von den letzteren zeigen am 21. X. 3 Ratten Lyssa.

Es geht daraus hervor, daß weder die karbolisierte normale Nervensubstanz (Lammgehirn) noch das karbolisierte Lyssagehirn (Kaninchen) imstande ist, eine Immunität gegen subkutane Infektion mit Virus Fermi zu erzeugen. Zum Teil überleben Tiere, sowie Kontrolltiere, zum Teil gehen sie, wenn sie auch die erste Infektion überleben, bei der zweiten zugrunde.

Jedenfalls geht aus diesen Versuchen hervor, daß normale Nervensubstanz Tiere gegen eine nachträgliche subkutane Infektion mit Virus Fermi nicht zu schützen vermag.

Da die vorangehenden Infektionsversuche lehren, daß die subkutane Infektion mit Virus Fermi inkonstante Resultate liefert, so dürfte das Ueberleben einzelner Tiere damit seine ausreichende Erklärung finden.

### **III. Sind im Serum der mit normaler Nervensubstanz vorbehandelten Tiere rabizide Substanzen nachweisbar?**

In Fortsetzung seiner Versuche über immunisierende Wirkungen normaler Nervensubstanz zeigt Fermi, daß Serum mit normalem Lammgehirn vorbehandelter Hunde und Kaninchen nicht nur in vitro Virus zu zerstören vermag, sondern es gelang Tiere, die gleichzeitig (getrennt) infiziert waren, und solche Tiere, die mit Virus fixe 24—48 Stunden, mit Straßenvirus 6—8 Stunden vor der Serumbehandlung infiziert waren, zum großen Teil am Leben zu erhalten (die mit Straßenvirus vorher infizierten Mäuse blieben alle am Leben, nur von den mit Virus fixe infizierten Mäusen ging ein Teil zugrunde). Fermi konnte einen Unterschied zwischen der Wirkung des Serums derjenigen Tiere (Hunde, Kaninchen), die mit Lyssagehirn vorbehandelt waren, und solchen, die mit normalem Lammgehirn immunisiert wurden, nicht nachweisen. Damit hat Fermi die Kette seines Beweisverfahrens geschlossen und auch den Beweis geliefert, daß die Immunität der mit normaler Nervensubstanz immunisierten Ratten auf rabizide Körper zurückzuführen sei.



Nachdem uns die aktive Immunisierung mit normalem Lammgehirn bei Ratten nicht gelungen ist und wir die Möglichkeit einer derartigen aktiven Immunisierung in Abrede stellen müssen, war es zwar ein aussichtsloses Beginnen, nach rabiziden Substanzen bei Tieren, die mit normaler Nervensubstanz vorbehandelt waren, zu suchen, immerhin haben wir auch diese Versuche ausgeführt.

Wenn auch Fermi in einer späteren Arbeit darauf hinweist, daß nicht von jeder Tierart mit normaler Nervensubstanz ein wirksames Serum zu gewinnen sein dürfte (so z. B. Ziege und Schaf), wollen wir doch in Anbetracht der Tatsache, daß Lyssagehirn bei Schafen wirksames rabizides Serum hervorruft, zunächst die Wirkung normaler Nervensubstanz bei Schafen studieren.

1. Versuch. Vom 6. IV. bis 16. IV. bekommt das Schaf 103 ccm Lammgehirn, am 27. IV. wird Aderlaß gemacht.

0,5 ccm Ser.	} + 1,0 ccm Virus fixe filtriert 1:100, 24 Std. bei Zimmertemperatur, davon subkutan 2 Kaninchen	} Lyssa +
0,1 " "		
0,05 " "		
0,01 " "		

2. Versuch. Vom 8. V. bis 30. V. tägl. 1 g norm. Kaninchengehirn, 18. VI. 1. Aderlaß.

0,5 ccm Ser.	} + 1,0 ccm Virus fixe filtriert 1:100, 20 Std. bei Zimmertemperatur	} Lyssa +
0,1 " "		
0,05 " "		

Vom 1. VII. bis 30. VII. bekommt das Schaf täglich 2 g Kaninchengehirn. 20. VIII. 2. Aderlaß.

0,1 ccm Ser.	} + 1,0 ccm Virus fixe Fermi filtriert 1:500, nach 24 Std. bei Zimmertemperatur subd. je 2 Kan.	} Lyssa +
0,05 " "		
0,01 " "		

3. Versuch. Vom 7. IX. bis 8. X. bekommt das Schaf 205 g Lammgehirn. 30. X. Aderlaß.

0,5 ccm Ser.	} + 1,0 ccm Virus fermi filtriert 1:100 nach, 24 Std. bei Zimmertemperatur subd. Kan.	} Lyssa +
0,1 " "		
0,05 " "		
0,01 " "		

Die Versuche zeigen, daß weder normales Kaninchengehirn noch Lammgehirn bei Schafen rabizide Substanzen hervorzurufen imstande ist. Es wäre merkwürdig, daß normale Nervensubstanz, der ja Fermi gleiche immunisierende Eigenschaft zuschreibt wie dem

Lyssagehirn, bei Schafen keine rabiziden Körper erzeugen sollte, wohl aber, wie frühere Versuche lehren, nur Lyssagehirn. Da aber Fermi selbst bei mit normaler Nervensubstanz vorbehandelten Schafe keine rabiziden Körper im Serum nachweisen konnte, wollen wir aus diesem Versuche keine Schlüsse ziehen und nur die Tatsache feststellen.

Die nächsten Versuche wurden an Kaninchen durchgeführt, die mit normalem Kaninchengehirn vorbehandelt waren. Die Versuche, mit Lammgehirn Kaninchen zu immunisieren, wurden aufgegeben, da die Kaninchen alle zugrunde gingen. Die mit Kaninchengehirn vorbehandelten Kaninchen hatten trotz langer Vorbehandlung im Serum keine nachweisbaren rabiziden Substanzen.

Mehr Erfolg versprochen wir uns von Hunden, die mit Lammgehirn vorbehandelt wurden, da nach Fermi bei diesen Tieren rabizide Körper mit normaler Nervensubstanz entstehen sollten.

1. Versuch. I. Hund bekommt vom 8. IX. bis 5. X. täglich 2,0 ccm Lammgehirn, karbol. 1-proz. (1:10). 25. X. 1. Aderlaß (Infektion am 3. XI. subdural Virus Fermi 1:10. 8. XI. Lyssa †.)

0,5 ccm Ser.	} + 1,0 ccm Virus Fermi filtriert 1:100, nach 24 Std. bei Zimmertemperatur subd. Kan.	} Lyssa †
0,1 " "		
0,05 " "		
0,01 " "		

2. Versuch. II. Hund bekommt vom 8. IX. bis 5. X. täglich 2,0 ccm Lammgehirn, Karbol 1-proz. (1:10). 25. X. Aderlaß (Infektion am 3. XI. subdural Virus Fermi 1:10. 8. XI. Lyssa †.)

0,5 ccm Ser.	} + 1,0 ccm Virus Fermi filtriert 1:100, nach 24 Std. bei Zimmertemperatur subd. Kan.	} Lyssa †
0,1 " "		
0,05 " "		
0,01 " "		

3. Versuch. III. Hund a) bekommt vom 27. VII. bis 27. VIII. täglich 2,0 ccm normales Kaninchengehirn (1:10). 15. IX. Aderlaß.

0,5 ccm Ser.	} + 1,0 ccm Virus Fermi filtriert 1:100, nach 24 Std. bei Zimmertemperatur subd. Kan.	} Lyssa †
0,1 " "		
0,05 " "		
0,01 " "		

b) Vom 16. IX. bis 25. X. bekommt der Hund täglich 5—10 ccm Lammgehirn, im ganzen 145 ccm. 16. XI. Aderlaß.

0,5 ccm Ser.	} + 1,0 ccm Virus Fermi filtriert 1:100, nach 24 Std. bei Zimmertemperatur subd. Kan.	} Lyssa †
0,1 " "		
0,05 " "		
0,01 " "		

4. Versuch. IV. Hund a) bekommt vom 27. VII. bis 27. VIII. täglich 2 ccm normales Kaninchengehirn (1:10). 15. IX. Aderlaß.

$$\left. \begin{array}{l} 0,5 \text{ ccm Ser.} \\ 0,05 \text{ " " } \\ 0,01 \text{ " " } \end{array} \right\} + 1,0 \text{ ccm Virus Fermi filtriert 1:100, nach 24 Std. } \left. \begin{array}{l} \text{subdural Kaninchen} \\ \text{Lyssa +} \end{array} \right\}$$

b) Bekommt vom 16. IX. bis 25. X. 145 ccm Lammgehirn, am 16. XI. Aderlaß.

$$\left. \begin{array}{l} 0,5 \text{ ccm Ser.} \\ 0,1 \text{ " " } \\ 0,05 \text{ " " } \\ 0,01 \text{ " " } \end{array} \right\} + 1,0 \text{ ccm Virus Fermi filtriert 1:100, nach 24 Std. } \left. \begin{array}{l} \text{bei Zimmertemperatur subd. Kan.} \\ \text{Lyssa +} \end{array} \right\}$$

Im Gegensatz zu diesen Versuchen führen wir noch zwei Versuche an, in welchen 2 Hunde mit karbolisiertem Virus Fermi (Kaninchen) vom 14. Nov. bis 3. Okt. vorbehandelt wurden (100 ccm), am 5. Nov. wurde Aderlaß gemacht und das Serum erwies sich in Mengen von 0,5 und 0,1 wirksam.

Weder das Serum der mit Kaninchengehirn, noch Serum der mit Lammgehirn vorbehandelten Tiere vermochte Lyssavirus in vitro anders zu beeinflussen als das Serum gesunder vorbehandelter Tiere. Die Versuche sind so eindeutig, daß wir nicht anstehen zu behaupten, daß der normalen Nervensubstanz immunisierende Eigenschaften in der hier besprochenen Richtung abzusprechen sind. Gerade diese Versuche sind beweisend dafür, daß die normale Nervensubstanz unmöglich aktiven Schutz gegen Lyssavirus verleihen kann, da das Serum der mit normaler Nervensubstanz vorbehandelten Tiere im Gegensatz zum Serum der mit Lyssavirus immunisierten Tiere nicht einmal in vitro sich als wirksam erwiesen hat. Es ist auch a priori die Behauptung zulässig, daß ein derartiges Serum, welches in vitro unwirksam ist, unmöglich die schützenden und heilenden Eigenschaften haben dürfte, welche Fermi ihm zuschreiben möchte.

#### IV. Ueber Heilversuche mit rabizidem Serum.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß das mit Lyssavirus gewonnene Serum von Hunden, Schafen und Pferden wohl spezifisch rabizide Eigenschaften besitze, bei direkter Kontaktwirkung in vitro Virus zerstöre, daß aber weder bei präventiver noch bei kurativer Anwendung irgendwelche Schutzwirkungen nachweisbar sind. Das Serum, welches in vitro

in Mengen von 0,05—0,01 ccm Lyssavirus 1 ccm (1:50, 1:100 filtriert) unwirksam macht, ist nicht imstande, bei getrennter, selbst gleichzeitiger Injektion oder wenn es präventiv angewendet wird, Tiere vor Ausbruch der Lyssa zu schützen. Diese Versuche widersprechen zunächst den älteren Angaben von Babes, namentlich aber denjenigen von Tizzoni und Centanni. Der Ausfall unserer neueren zahlreichen ausgedehnten Versuchsreihen hat nun wieder gezeigt, daß dem Serum im Organismus, wenn es präventiv und kurativ zur Anwendung kam, keinerlei Wirkungen zukommen. In diesen Versuchen wurde rabizides Virus fixe Wien subdural oder Straßenvirus intraokular verwendet. In neueren Versuchen haben wir den Virus Fermi zur Infektion benutzt und die Tiere subkutan infiziert.

1. Versuch. 1 ccm Virus Fermi 1:10 filtriert subkutan und subdural Kan.

Nach 1, 4, 8 und 24 Stunden Serum Euklid subkutan und intravenös.

3,0 ccm Ser.	subkutan	1 Std. nach der subkut. Infekt.	Kan. 265	} leben
3,0 "	"	1 "	" " " subdur. "	
5,0 "	"	4 "	" " " subdur. "	
5,0 "	"	4 "	" " " subdur. "	
10,0 "	"	8 "	" " " subdur. "	} Lyssa †
10,0 "	"	8 "	" " " subdur. "	
3,0 "	intravenös	1 "	" " " subdur. "	} "
3,0 "	"	1 "	" " " subdur. "	
5,0 "	"	4 "	" " " subdur. "	} Lyssa †
5,0 "	"	4 "	" " " subdur. "	
10,0 "	"	8 "	" " " subdur. "	} Lyssa †
10,0 "	"	8 "	" " " subdur. "	

Dieser Versuch würde, wenn er bei Wiederholung dasselbe Resultat ergeben hätte, sicher im Sinne Fermis sprechen.

2. Versuch. 1 ccm Virus Fermi 1:10 filtriert subkutan.

Nach 1, 4, 8, 24 Stunden Serum Euklid subkutan und intravenös.

3,0 ccm Serum	subkutan	1 Std. nach der Infektion	Kan. 262	Lyssa †
5,0 "	"	4 "	" " " " "	" †
10,0 "	"	8 "	" " " " "	" †
3,0 "	intravenös	1 "	" " " " "	" †
5,0 "	"	4 "	" " " " "	" †
10,0 "	"	8 "	" " " " "	" †
10,0 "	"	24 "	" " " " "	" †

Im früheren Versuch blieb das subkutan infizierte Kaninchen, wenn 1 und 4 Stunden später Serum injiziert wurde, am Leben, hier gehen die Tiere zugrunde. Im gleichen Versuch bleiben Kaninchen, die 8 und 24 Stunden nach der Infektion mit Serum behandelt werden, am Leben. Dagegen gehen die

Tiere an Lyssa zugrunde, bei welchen 1 und 4 Stunden nachher Serum intravenös injiziert wurde. Auch diese Widersprüche lassen sich nicht anders als aus Zufällen erklären.

Namentlich sprechen folgende Versuche gegen eine kurative Wirksamkeit des rabiziden Serums.

1. Versuch. Serum peritoneal, nach 24 Stunden Infektion mit Virus Fermi filtriert 1:10 subdural und subkutan.

3,0 ccm Ser.	Euklid peritoneal, nach 24 Stunden 1,0 ccm V. Fermi filtriert 1:10	subkut. Kan. 254	Lyssa +
3,0 " "		" " 164	lebt
5,0 " "		" " 112	"
10,0 " "		" " 499	Lyssa +
10,0 " "		" " 191	" +
5,0 " "		subdur. " 328	" +

2. Versuch. Serum peritoneal, nach 48 Stunden Virus Fermi 1:10 filtriert subkutan.

3,0 ccm Ser.	Euklid peritoneal, nach 48 Stunden 1,0 ccm V. Fermi filtriert 1:10	subkut. Kan. 179	Lyssa +
5,0 " "		" " 496	
10,0 " "		" " 419	

3. Versuch. Serum peritoneal, nach 48 Stunden Virus Fermi filtriert 1:10 subdural.

0,5 ccm Serum Euklid	peritoneal, nach 48 Std. 1 ccm Virus Fermi	subdur. Kan. 413	Lyssa +
10,0 " " "		" " 246	lebt
5,0 " norm. Pferdeser.		" " 376	Lyssa +
10,0 " " "		" " 82	lebt

Es gelingt nicht einmal bei 24- und 48-stündiger Vorbehandlung mit Serum, Kaninchen nach subkutaner und subduraler Infektion vor Ausbruch der Lyssa zu schützen. Damit ist auch wahrscheinlich gemacht, daß die einzelnen überlebenden Tiere im kurativen Versuch nicht infolge der Seruminjektion überleben.

Im ersten Kapitel haben wir ja gezeigt, daß die subkutane Infektion mit Virus Fermi nicht absolut sicher Lyssa zu erzeugen vermag, so daß trotz Infektion einzelne Tiere am Leben bleiben. Für diese Annahme spricht auch folgender Versuch:

Virus Fermi filtriert 1:10 wird intravenös Kaninchen in den Nerv. isch. injiziert, nach 1, 4, 8 Stunden wird Serum intravenös injiziert.

1,0 ccm Serum Euklid	1 Std. nach der Infektion	Kan. 41	lebt
1,0 " norm. Pferdeserum	1 " " " "	" 281	"
1,0 " Serum Euklid	4 " " " "	" 115	"
1,0 " norm. Pferdeserum	4 " " " "	" 486	Lyssa +
1,0 " Serum Euklid	8 " " " "	" 224	" +
1,0 " norm. Pferdeserum	8 " " " "	" 336	lebt

Um zum Schluß noch allen Forderungen Fermis gerecht zu werden, haben wir diese Heilversuche noch an weißen Ratten ausgeführt. Fermi glaubt nämlich, daß die Wirksamkeit der Sera nur bei Muriden zum Ausdruck gelangt, wenigstens sicherer als bei Hunden und Kaninchen.

1. Versuch an weißen Ratten. Virus Fermi filtriert 1:10 subkutan, nach 4, 8 und 24 Stunden Serum Euklid und normales Pferdeserum subkutan.

2,0 ccm	Serum Euklid	4 Stunden nach der Infektion		
4,0	„ „ „	4	„ „ „ „	} leben
2,0	„ „ „	8	„ „ „ „	} lebt
4,0	„ „ „	8	„ „ „ „	
2,0	„ „ „	24	„ „ „ „	} Lyssa †
4,0	„ „ „	24	„ „ „ „	
2,0	„ norm. Pferdeserum	4	„ „ „ „	} Lyssa
4,0	„ „ „	4	„ „ „ „	} lebt
2,0	„ „ „	8	„ „ „ „	
4,0	„ „ „	8	„ „ „ „	} leben
2,0	„ „ „	24	„ „ „ „	
4,0	„ „ „	24	„ „ „ „	} Lyssa †

## 2. Versuch.

2,0 ccm	Serum Euklid	4 Std. nach der Inf. mit V. Fermi subk.		
4,0	„ „ „	4	„ „ „ „ „ „ „ „	} leben
2,0	„ „ „	8	„ „ „ „ „ „ „ „	} Lyssa †
4,0	„ „ „	8	„ „ „ „ „ „ „ „	} lebt
2,0	„ „ „	24	„ „ „ „ „ „ „ „	
4,0	„ „ „	24	„ „ „ „ „ „ „ „	} Lyssa †
4,0	„ norm. Pferdeser.	4	„ „ „ „ „ „ „ „	
4,0	„ „ „	8	„ „ „ „ „ „ „ „	} Lyssa †
4,0	„ „ „	8	„ „ „ „ „ „ „ „	
4,0	„ „ „	24	„ „ „ „ „ „ „ „	} lebt

Diese Versuche brauchen nicht erst weiter diskutiert zu werden. Es geht daraus hervor, daß infizierte Ratten wahllos am Leben bleiben und an Lyssa zugrunde gehen, ob sie nachträglich mit rabizidem oder normalem Pferdeserum nachbehandelt wurden. Einerseits lehren diese Versuche außerdem, daß der Infektionsmodus (subkutan) mit Virus Fermi ungleichmäßige Resultate liefert, andererseits daß man jede präventive oder kurative Wirkung dem rabiziden Serum absprechen muß.

Wir befinden uns mit unseren hier mitgeteilten Resultaten in Uebereinstimmung mit Marie, Remlinger, Krajuschkina. Auch diese Autoren bestreiten die immunisierende Eigenschaft der normalen Nervensubstanz und die Heilwirkung des rabiziden Serums.

### Zusammenfassung.

1) Es gibt Lyssavirus (Virus Fermi [fixe]), welches von der Subcutis aus bei Mäusen, Ratten, Kaninchen Lyssa zu erzeugen vermag, jedoch sind die Resultate inkonstant.

2) Biologisch ist Virus Fermi als identisch anzusehen mit Virus fixe anderer Institute, z. B. Wien, welches subkutan nicht zu infizieren vermag.

3) Gänse (Hühner) sind für Virus Fermi unempfindlich.

4) Normale Nervensubstanz (Lamm-, Kaninchen-gehirn) besitzt keine immunisierenden Eigenschaften, sie vermag weder Tiere aktiv gegen Lyssavirus zu immunisieren, noch entstehen nach Vorbehandlung rabizide Körper.

5) Nur Lyssavirus (Gehirn) ist imstande, aktive Immunität bei Tieren hervorzurufen. Im Serum dieser Tiere mit Ausnahme von Hühnern (Kraus und Maresch) sind spezifisch rabizide Körper nachweisbar.

6) Das rabizide Serum hat die Eigenschaft, in vitro Virus zu zerstören, bei getrennter Anwendung im präventiven oder kurativen Versuch versagt es.

7) Das mit normaler Nervensubstanz gewonnene Serum Fermi kann demnach weder präventive noch kurative Eigenschaften besitzen.

### Literatur.

Fermi, Virch. Arch., 1907.

— Centralbl. f. Bakt., 1908, 1909.

— Zeitschr. f. Hyg., 1907.

Kraus und Fukuhara, Wiener klin. Wochenschr., 1908.

Kraus, Handb. der Technik u. Methodik der Immunitätsforschung, Bd. 2.

Marie, L'étude expér. de la rage. Paris (Doin et fils) 1909.

Krauschkina, Deutsche med. Wochenschr., 1909.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien  
(Hofrat Prof. Paltauf) und der Universitätskinderklinik  
(Hofrat Prof. Escherich).]

**Ueber passive Uebertragung der Tuberkulin-Ueberempfindlichkeit bei Meerschweinchen.**

Von Dr. Henry F. Helmholz, Chicago U.S.A.

(Eingegangen bei der Redaktion am 27. Juli 1909.)

Die folgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, ob durch passive Uebertragung des Blutserums tuberkulöser Meerschweinchen gesunde Meerschweinchen für die kutane Tuberkulinprobe nach v. Pirquet überempfindlich gemacht werden können und gleich den tuberkulösen Tieren auf Tuberkulin reagieren.

Zunächst wurde die kutane Reaktion mit Tuberkulin bei gesunden und dann bei tuberkulösen Meerschweinchen ausgeführt.

Um über die Reaktionsfähigkeit der normalen Haut orientiert zu sein, wurden an 17 normalen Tieren Impfungen vorgenommen und nur bei zwei von den Tieren zeigte sich eine ganz geringe 0,2—0,3 cm breite farblose Papel. Um ganz sicher zu gehen, wurde keine Reaktion als positiv bezeichnet, die nicht wenigstens 0,5 cm im Durchmesser war und deutliche Rötung zeigte. Von 23 tuberkulösen Tieren reagierten 4 gar nicht, 2 mit einer Reaktion von 0,4, 1 mit 0,6, 8 mit 0,7, 3 mit 0,8, 1 mit 0,9, 3 mit 1,0 und 1 mit 1,2 ccm.

Von diesen Resultaten ausgehend, durfte angenommen werden, daß eine negative Reaktion nicht zu verwerten sei, wohl aber eine positive Reaktion.

Seit den Untersuchungen von Kraus und Doerr wissen wir, daß Tiere, die mit Bakterien in bestimmter Weise vorbehandelt sind, sensibilisiert werden und daß in deren Serum der anaphylaktische Reaktionskörper (Sensibilin) nachweisbar ist. Ob während der Infektion auch solche Antikörper entstehen, ist bis heute nicht nachgewiesen. Ob die Tuberkulinreaktion als eine anaphylaktische (allergische) Reaktion aufzufassen ist, wie es einzelne Autoren (v. Pirquet, Wolf)



annehmen, muß offen gelassen werden, nachdem direkte Beweise bisher nicht erbracht worden sind.

Es lag nach dem Vorliegenden nahe, den Versuch zu machen, ob nicht durch die Einverleibung des Blutes eines stark reagierenden tuberkulösen Tieres auf ein normales Meerschweinchen die Reaktionsfähigkeit übertragen werden könnte. Ein Versuch mit einer anderen Methodik (die Reaktion von tuberkulösen Tieren auf große Dosen Tuberkulin intraperitoneal) liegt schon vor<sup>1)</sup>. Es war mit dieser Methode nicht gelungen, eine Umstimmung des Organismus nachzuweisen. Da die Methode aber sehr grob ist, war ein Ausschlag kaum zu erwarten. Unsere Versuchsanordnung war folgende: Stark kutan reagierende Tiere wurden entblutet, das Blut steril aufgefangen, defibriniert und so bald als möglich normalen Tieren intraperitoneal eingespritzt. Die normalen Tiere waren ein oder mehrere Male vor der Einspritzung, und täglich nach der Injektion kutan mit Alttuberkulin auf dem Rücken geimpft.

Versuch I. No. 144. Normales Meerschweinchen.

24. V.	Kutanimpfung	25. VI.	0
25. V.	5 ccm Blut von einem tuberkulösen Tier, das mit einer 0,7 Papel reagierte, Kutanreaktion am	26. VI.	0
26. V.	Kutanimpfung	27. VI.	0
27. V.	"	28. VI.	Gerötet und infiltriert 0,5 cm
28. V.	"	29. VI.	0,5 "
1. VI.	"	2. VI.	0,7" cm "gerötete" Papel
4. VI.	"	3. VI.	0,4 " " "
5. VI.	"	6. VI.	0,4 " " "

Versuch II. No. 199. Normales Meerschweinchen.

1. VI.	Kutanimpfung	2. VI.	Reaktion 0
2. VI.	4 ccm Blut von einem tuberkul. Tier, das mit 0,7 Papel reagierte, intraperitoneal injiziert		
3. VI.	Kutanreaktion	0	
3. VI.	Kutanimpfung	4. VI.	0
4. VI.	"	5. VI.	0,4 cm rote Papel. noch vorhanden
5. VI.	"	6. VI.	kleine rote Papel. Tier schwach
6. VI.	"	7. VI.	geringe Infiltration.

Versuch III. No. 131. Normales Meerschweinchen.

6. VI.	Kutanimpfung	7. VI.	0
7. VI.	"	8. VI.	0
8. VI.	5 ccm Blut, gemischt von zwei tuberkulösen Tieren, die mit 0,7 und 1,0 Papel reagierten, intraperitoneal injiziert		
8. VI.	Kutanimpfung	9. VI.	0
9. VI.	"	10. VI.	0,5 cm gerötete Papel
10. VI.	"	11. VI.	nur kleine gerötete Papel, 0,4 cm
12. VI.	"	13. VI.	0,3 cm gerötete Papel
13. VI.	"	14. VI.	0,3 " " "

1) Ulrich Friedmann, Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 49.

Versuch IV. No. 142. Normales Meerschweinchen.

6. VI.	Kutanimpfung	7. VI.	0
7. VI.	"	8. VI.	0
8. VI.	5 ccm Blut intraperitoneal injiziert (Blut wie III)		
8. VI.	Kutanimpfung	9. VI.	0
9. VI.	"	10. VI.	0,4 cm gerötete Papel
10. VI.	"	11. VI.	0,5 " " "
11. VI.	"	12. VI.	0,6 " " "
12. VI.	"	13. VI.	0,7 " " "
13. VI.	"	14. VI.	0,3 " " "

Versuch V. No. 145. Normales Meerschweinchen.

6. VI.	Kutanimpfung	7. VI.	0
7. VI.	"	8. VI.	kleine blasse Papel 0,3 ccm.
8. VI.	4 ccm Blut intraperitoneal (Blut wie III u. IV)		
8. VI.	Kutanimpfung	9. VI.	kleine blasse Papel
10. VI.	"	11. VI.	0,5 cm gerötete Papel
11. VI.	"	12. VI.	0,7 " " "
12. VI.	"	13. VI.	0,6 " " "
13. VI.	"	14. VI.	0,5 " " "

Versuch VI. No. 158. Normales Meerschweinchen.

6. VI.	Kutanimpfung	7. VI.	0
7. VI.	"	8. VI.	0
8. VI.	5 ccm Blut intraperitoneal (wie III, IV u. V)		
8. VI.	Kutanimpfung	9. VI.	geringe blasse Papel
9. VI.	"	10. VI.	0,4 cm leicht gerötete Papel
10. VI.	"	11. VI.	0,4 " " "
11. VI.	"	12. VI.	0,6 " rote Papel "
12. VI.	"	13. VI.	0,6 " " "
13. VI.	"	14. VI.	0,4 " " "

Es war von vornherein nicht zu erwarten, daß die Reaktionen so stark ausfallen würden wie bei den tuberkulösen Tieren, von denen das Blut entnommen wurde, und doch war es im einzelnen Versuche der Fall. Von den sechs Versuchen fielen fünf stark positiv aus, ein Versuch, No. II, reagierte mit einer Papel von 0,4 cm Durchmesser. Obwohl bei diesen Versuchen keine so großen Reaktionen zu erwarten waren wie in tuberkulösen Tieren, wird es wohl gut sein, 0,5 cm Durchmesser als die untere Grenze für die positive Reaktion beizubehalten. In den fünf positiven Versuchen waren die Reaktionen schon 2 Tage nach der intraperitonealen Injektion positiv. In vier Versuchen war die größte Reaktion 4—6 Tage nach der Injektion und nahm dann wieder ab, und zwar waren die größten Reaktionen 0,6, 0,7, 0,7, 0,7 cm im Durchmesser, im fünften Versuch war die Reaktion 0,5 cm im Durchmesser nach 2 Tagen und nahm von da an ab. Bei intraperitoneal infizierten Tieren

sieht man erst nach 7—10 Tagen eine Kutanreaktion auftreten, und manchmal noch später.

Auch der folgende Versuch demonstriert die Uebertragbarkeit der Ueberempfindlichkeit für kutane Tuberkulinimpfung.

Ein stark reagierendes tuberkulöses Tier wurde an ein normales, vorher geprüftes nicht reagierendes Tier genäht, und zwar so, daß die Tiere eine gemeinsame Bauchhöhle hatten (Parabiose). Die ersten 24 Stunden wurden die Tiere mit Pflaster zusammen auf eine Pappendeckelunterlage gebunden und dann in einen Gipsverband gelegt, in dem sie die ganzen 2 Wochen darinblieben. Täglich nach der Operation wurden Kutanimpfungen an dem Bauch beider Tiere ausgeführt, durch Fenster, die in den Gipsverband eingeschnitten wurden. (An dieser Stelle möchte ich Dr. Hans Erlich für die Operation danken.)

13. V. Normales schwarzweißes Meerschweinchen. Kutan geimpft.  
 14. V. Keine Kutanreaktion.  
 14. V. Normales Meerschweinchen an ein tuberkulöses Tier, Peritoneum an Peritoneum, genäht. Beide am Bauch geimpft.

	Zeit	Tuberkulöses Tier	Normales Tier
15. V.	1. Tag	Infiltrat und Rötung, 0,6 × 1,0 cm	0
17. V.	3. „		0
18. V.	4. „	Infiltrat und Rötung, 0,7 cm	kleiner roter Hof um die Impfstelle, 0,3 cm
19. V.	5. „	rotes Infiltrat, 0,7 cm	kleine rote Papel, 0,4 cm
20. V.	6. „	Rötung und Infiltrat, 0,5 cm	Papel mit rotem Hof, 0,5 cm. Infiltrat nicht so stark wie im tuberkulösen Tier
21. V.	7. „	rote Infiltration, 0,7 cm	stark gerötet, mäßig infiltriert, 1,2 × 0,8 cm
24. V.	10. „	Stichreaktion, 1,2 cm Infiltration	Stichreaktion, 1,0 cm Infiltration
25. V.	11. „	mäßige Infiltration und Rötung, 0,6 cm	mäßige Rötung und Infiltration, 0,7 cm
26. V.	12. „	geringe Infiltration und Rötung, 0,4 cm	geringe Infiltration und Rötung, 0,4 cm
27. V.	13. „	fast keine Reaktion	fast keine Reaktion
28. V.		Tuberkulöses Tier starb um 8 Uhr morgens. Normales um 2 Uhr nachmittags.	

Sektion: Ausgebreitete Tuberkulose des Netzes, der Milz, der Leber und der Lungen des tuberkulösen Tieres.

Normales Tier. Keinerlei makroskopische Veränderungen des Netzes oder der Drüsen. Milz unverändert. Nicht mikroskopisch untersucht. Operationswunde tadellos geheilt.

Die ersten 3 Tage nach der Operation zeigte das normale Tier keine Reaktion um die Impfstelle;

das tuberkulöse Tier zeigte eine starke Reaktion. Vom 4. Tage an fing beim gesunden Tier die Reaktion sich einzustellen, und zwar wurde sie bis zum 7. Tage immer größer, so daß sie an diesem Tage eine Größe von  $1,2 \times 0,8$  cm erreichte. Von diesem Tage an bis zum Tode nahmen die Reaktionen in beiden Tieren allmählich ab, so daß sie am 13. Tage fast ganz ausblieben. Trotz guter Pflege magerten die Tiere immer mehr ab, und es schien fast, als ob die Reaktion im selben Verhältnis abnahm wie das Gewicht, und 14 Tage nach der Operation starben die Tiere.

Wie die Arbeiten von Friedberger und Nassetti<sup>1)</sup> und von Ranzi und Ehrlich<sup>2)</sup> über Parabiose zeigen, dauert es 4 Tage, bis sich die Gefäßanastomosen ausbilden, so daß erst dann ein Blutaustausch stattfindet. Dieses stimmt auffallend mit den Kutanreaktionen überein. Während der ersten 3 Tage blieben die Reaktionen ganz aus. Nach dem 4. Tage aber fingen sie an sich einzustellen, um ihren Höhepunkt am 7. Tage zu erreichen. In infizierten Tieren sieht man nach 7 Tagen noch keine solchen Reaktionen. Es war leider unmöglich, den Versuch nochmals durchzuführen, und alleinstehend war er wohl wenig beweisend, im Zusammenhang aber mit den positiven Befunden in den Injektionsversuchen ist er doch sehr beweisend, daß es möglich ist, passiv die Ueberempfindlichkeit gegen Tuberkulin von einem Tier auf das andere zu übertragen.

#### Zusammenfassung.

I. Tuberkulöse Meerschweinchen zeigen fast alle zu gleicher Zeit eine positive Kutanreaktion.

II. Diese Reaktionsfähigkeit kann passiv durch das Blut tuberkulöser Meerschweinchen auf gesunde übertragen werden.

Zum Schlusse möchte ich noch den Herren Prof. Kraus und Hofrat Prof. Escherich danken für das rege Interesse das sie an dieser Arbeit nahmen.

1) Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 2, Heft 5.

2) Ibid., Bd. 3, Heft 1.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem k. k. hygienisch-bakteriologischen Institut der Jag.  
Universität Krakau; Vorstand: Prof. O. Bujwid.]

### **Ueber die Wassermannsche Probe mit künstlichem Antigen <sup>1)</sup>.**

Von Dr. **Philipp Eisenberg** und Dozent Dr. **Roman Nitsch**,  
Assistenten am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 27. Juli 1909.)

Die zahlreichen Modifikationen der Wassermannschen Probe, die in den letzten 2 Jahren von verschiedenen Seiten vorgeschlagen wurden, beweisen, daß diese Reaktion in ihrer klassischen Form noch nicht als endgültig vollendet zu betrachten ist. Das Material von 10—20 000 Fällen, das in der Flut von Publikationen niedergelegt ist, könnte einen viel höheren Wert für sich beanspruchen, als ihm gegenwärtig zukommt, wenn es auf Grund einer einheitlichen Technik aufgebaut und daher ohne weiteres vergleichbar wäre. Aber von den zahlreichen Faktoren, die an der Reaktion teilnehmen, stellt kein einziger eine konstante, wohldefinierte Größe vor. Weder die Erythrocyten, noch das Komplement, noch der hämolytische Ambozeptor, noch das untersuchte Menschen-serum sind als solche zu betrachten und können es auch ihrer Natur nach nicht sein, und es müßte eigentlich bei der Beurteilung der Resultate jeder Probe ihre Individualität mit in Betracht gezogen werden. Nur ein Faktor — wir meinen das Antigen — könnte stabilisiert und vereinheitlicht werden und man könnte dadurch wenigstens eine gewisse Basis für eine vergleichende Bewertung der Resultate verschiedener Forscher schaffen. Das gilt nun freilich nicht vom Antigen in seiner jetzt allgemein gebrauchten Form der Extrakte aus luetischen Lebern. Nach den Erfahrungen mancher Autoren können die von Wassermann und von Citron warm befürworteten wässerigen Extrakte bei längerer Aufbewahrung ihre Spezi-

---

1) Nach einem Vortrag, gehalten am I. polnischen Kongreß f. inn. Med. zu Krakau am 21. Juli 1909.

fizität einbüßen. Die alkoholischen Extrakte scheinen stabiler zu sein, doch sind auch bei ihnen Veränderungen nicht ausgeschlossen, die einen Vergleich der mit ihnen zu verschiedenen Zeiten erhaltenen Resultate in Frage stellen könnten. Noch wichtiger sind wohl die Beobachtungen, welche darthun, daß verschiedene alkoholische Extrakte mit denselben Seris zum Teil divergierende Resultate liefern können (Seligmann und Klopstock, Halberstädter, Müller und Reiche, Bruck und Cohn, Seligmann). Auch unsere Versuche lieferten uns einige recht prägnante Beispiele eines differenten Reagierens einiger alkoholischer Extrakte. Hier eins davon:

Tabelle I.

	Antigen L	Antigen N	Antigen C
Serum 1192 Bl.	+ +	+ +	+ +
„ 1195 Bl.	+ +	+ +	+ +
„ 1195 Ves.	+	+	±
„ 1205 Bl.	— +	— +	— —
„ 1169 Bl.	—	+	—

Erklärung. Das erste Zeichen bedeutet das Resultat der Probe mit 0,1 ccm Serum, das zweite derjenigen mit 0,05 ccm Serum (Gesamt-volumen der Proben = 2,5 ccm). + bedeutet vollständige Hämolyse (negatives Resultat), — vollständige, ± partielle Hemmung.

Wir sehen also, daß zwei Sera mit allen drei Antigenen übereinstimmende Resultate ergeben, zwei quantitativ verschiedene, eins sogar prinzipiell verschiedene: mit zwei Antigenen Hemmung, mit einem totale Hämolyse. Auch der in folgender Tabelle II enthaltene Versuch, zu dem 6 natürliche und 3 (noch zu besprechende) künstliche Antigene herangezogen wurden, zeigt die Erscheinung in ganz auffallender Weise (s. Tabelle II auf p. 378).

Die Kontrollen der Antigene und Sera sowie des hämolytischen Systems waren alle einwandfrei.

Wir ersehen aus der Tabelle, daß von 8 untersuchten Seris nur 2 vollkommen negative, mit allen Antigenen übereinstimmende Resultate gaben, die anderen 6 gaben mit den einzelnen Antigenen, zum Teil quantitativ, zum Teil aber auch qualitativ verschiedene Resultate. Antigen C sowie unser S.-R. geben je 5, S.-R. Or. sowie S.-R. ohne Oleinsäure je 4, L und N je 3, S und E je 2, V nur 1 positives Resultat,

Tabelle II.

Resultate nach 2<sup>h</sup> bei 37° C.

Sera	Antigene								
	L	C	V	S	N	E	S.-R. Or.	unser S.-R.	S.-R. ohne Oleins.
1266 Bl.	$\overline{+}$ +	— $\overline{+}$	+ +	+ +	— +	+ +	$\mp$ $\times$ +	— $\mp$ $\times$	— $\mp$ +
186 Bl.	— —	— —	— —	— +	— —	— $\times$	$\overline{+}$ $\pm$ $\times$	— $\overline{+}$ $\pm$	— $\mp$ $\pm$
Rab. Bl.	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +
1263 Bl.	+ +	$\overline{+}$ +	+ +	+ +	+ +	+ +	$\pm$ + +	$\mp$ + +	$\pm$ + +
1262 Bl.	+ +	$\pm$ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ + +	$\pm$ + +	$\times$ + +
1261 Bl.	+ +	— $\pm$	+ +	+ +	— +	+ +	$\overline{+}$ + +	— — $\mp$	— $\overline{+}$ $\times$
1283 Bl.	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +
1276 Ves.	— +	— $\overline{+}$	+ +	— $\times$	+ +	— +	— — —	— — —	— — —

+ vollständige Hämolyse,  $\times$  fast vollständige Hämolyse,  $\pm$  partielle Hemmung,  $\mp$  starke Hemmung,  $\overline{+}$  fast vollständige Hemmung, — vollständige Hemmung.

wir haben also eine ganze Stufenleiter verschiedener Empfindlichkeit der Antigene vor uns.

Außerdem aber sind luetische Lebern ein nicht immer leicht zu beschaffendes Material, wegen natürlichem Mangel in kleineren Städten, wegen übergroßer Nachfrage in den großen Zentren. Diese Schwierigkeit wird bei Verwendung der Extrakte aus normalen Organen vermieden, doch auch diese sind von individuellen Unterschieden nicht frei.

Es folgt daraus, daß die natürlichen Extrakte die oben begründete Forderung der Einheitlichkeit nicht erfüllen und es erscheinen in diesem Lichte die Bestrebungen gerechtfertigt, die die natürlichen Antigene durch künstliche ersetzen wollen. Die ersten dahinzielenden Versuche mit Lecithin, Cholestearin, Vaseline, sowie mit Seifen gaben zwar positive Resultate, diese waren jedoch nicht spezifisch genug, um diesen Stoffen eine erfolgreiche Konkurrenz mit den natürlichen Anti-

genen zu ermöglichen. Auf einer Kombination von Lecithin, oleinsaurem Natron sowie Oleinsäure beruht der neueste Versuch in dieser Richtung, der vor einem halben Jahr von Sachs und Rondoni unternommen wurde. Dank dem liebenswürdigen Entgegenkommen von Herrn Prof. Sachs, der die Güte hatte, uns eine größere Menge seines Gemisches zu überlassen, konnten wir eine Reihe von vergleichenden Untersuchungen mit diesem Antigen und mit alkoholischem Extrakt aus luetischer Leber ausführen, über die im folgenden berichtet werden soll.

Bezüglich der Technik der Wassermannschen Reaktion sei bemerkt, daß wir die klassische Methode befolgt haben, wie sie in der Breslauer Klinik gehandhabt wird und von Taeye beschrieben worden ist. Der Unterschied bestand darin, daß erstens das Gesamtvolum der Proben zwecks Materialersparnis anfangs 2,5 ccm, sodann aber nur 1,5 resp. 1 ccm betrug, natürlich unter Einhaltung der relativen Mengenverhältnisse, zweitens darin, daß vor jeder Versuchsserie der Ambozeptor genau austitriert wurde, drittens aber darin, daß die Resultate nach 45 Minuten resp. 2-stündigem Aufenthalt im Thermostaten, sodann nach 15—20-stündigem Aufenthalt in Zimmertemperatur abgelesen wurden. Neben der Wassermannschen Probe wurde in vielen Fällen auch die Bauersche angestellt, deren Resultate als weitere Kontrolle für die Ergebnisse der künstlichen Antigene dienten. Diese letzteren Versuche wurden natürlich unter genauer Einhaltung der von Sachs und Rondoni gegebenen Vorschriften ausgeführt.

Als Material für unsere Untersuchungen benutzten wir Sera, die wir der Freundlichkeit der Herren Prim. Dr. E. Borzęcki, Prim. Dr. A. Krokiewicz, Prof. Dr. St. Pareński, Prof. Dr. W. Jaworski, Dr. St. Lapiński, sowie Prof. O. Bujwid verdanken; all diesen Herren sprechen wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aus. Dieses Material stammt zumeist aus einer Abteilung für Haut- und Geschlechtskranke, außerdem aus inneren Abteilungen sowie aus der Privatpraxis und entspricht bezüglich seiner Zusammensetzung ungefähr dem Material, das bisher das Substrat für die meisten Untersuchungen über die Wassermannsche



Reaktion abgegeben hat. Unter 164 untersuchten Seris haben 85 ein positives, 79 ein negatives Ergebnis. Mit dem Original-Antigen von Sachs und Rondoni wurden 133 Proben angestellt. Entsprechend dem allgemeinen Brauch wurden bei der Wassermannschen Reaktion nur totale oder fast totale Hemmungen als positiv, partielle dagegen als negativ betrachtet, ebenso auch partielle Hemmungen in dem ersten Röhrchen bei der Methode von Sachs und Rondoni (übereinstimmend mit Facchini). Unter diesen 133 Proben haben 117 übereinstimmende Resultate mit beiden Antigenen, 16 dagegen mehr oder weniger divergierende. Diese anscheinend hohe Ziffer nicht übereinstimmender Resultate gewinnt jedoch ein anderes Aussehen, wenn wir die betreffenden Ergebnisse näher betrachten. Prinzipiell differierende Resultate, d. h. totale Hemmung mit einem Antigen, totale Hämolyse mit dem anderen gaben 8 Proben, in den restlichen 8 waren die Ergebnisse nur quantitativ verschieden. Besondere Beachtung verdient aber der Umstand, daß unter diesen 16 divergierenden Resultaten das S.-R. Or.<sup>1)</sup> 10mal sich dem natürlichen Antigen überlegen zeigte, d. h. bei luetischen Individuen positive Reaktion gab, während das natürliche Antigen negativ oder zweifelhaft reagierte, nur 6mal war das Umgekehrte der Fall. Bei Sachs und Rondoni erwies sich ihr künstliches Antigen etwas weniger empfindlich als das von ihnen benutzte natürliche. Facchini, der 135 Sera vergleichsweise untersuchte, bekam mit künstlichem Antigen 66,66 Proz., mit natürlichem 84 Proz. positiver Resultate, er gibt jedoch selber zu, daß das von ihm gebrauchte natürliche Antigen die meisten gebräuchlichen an Empfindlichkeit übertroffen haben dürfte. Nach unseren Untersuchungen scheint das S.-R. Or. etwas empfindlicher zu sein als das natürliche Antigen, doch möchten wir diesem günstigen Ergebnis kein allzugroßes Gewicht beilegen, wenn wir berücksichtigen, daß das Vergleichsobjekt bei dieser Bewertung — das natürliche Antigen — nicht als konstante Größe betrachtet werden kann, wie schon oben hervorgehoben wurde. Je nach dem Empfindlichkeitsgrad des in einer Versuchsserie benutzten natürlichen Antigens wird das Urteil

---

1) Bedeutet: Original-Antigen A von Sachs und Rondoni.

über das künstliche Antigen mehr oder weniger günstig ausfallen. Ein Beispiel dafür gaben uns unsere eigenen Versuche, in denen wir nacheinander zwei natürliche Antigene L und C benutzten, und zwar mit folgendem Ergebnis:

- I. Serie: 86 Proben (Ant. L), 7 differ. Resultate, 7 zugunsten des S.-R. Or.,  
0 zugunsten des natürlichen Antigens.
- II. Serie: 47 Proben (Ant. C), 9 differ. Resultate, 3 zugunsten des S.-R. Or.,  
6 zugunsten des natürlichen Antigens.

Das Antigen C erwies sich also als empfindlicher, das Antigen L als weniger empfindlich als das in beiden Reihen konstant benützte künstliche Antigen S.-R. Or.

Nachdem wir im allgemeinen ganz zufriedenstellende Resultate mit dem aus Frankfurt zugesandten künstlichen Antigen erhalten haben, gingen wir dazu über, dieselben mit einem von uns selbst genau nach Sachs und Rondonis Vorschrift hergestellten Antigen zu kontrollieren. Dieses Antigen war etwas mehr dunkelgelb als das Frankfurter, vielleicht deswegen, weil das Lecithin (ex ovo Merck), welches zu seiner Herstellung diente, schon beinahe  $1\frac{1}{2}$  Jahre in unserem Laboratorium bei Zimmertemperatur aufbewahrt war.

Unter 86 Proben, in welchen wir dieses Antigen und ein natürliches vergleichend untersuchten, fielen 74 übereinstimmend und 12 nicht übereinstimmend aus: von den letzteren waren 7 ganz und 5 nur teilweise divergent, dabei fielen 8 Proben zugunsten und 4 zu ungunsten unseres Antigens aus. Im allgemeinen schien dieses von uns hergestellte Antigen etwas empfindlicher als das Frankfurter zu sein, weil es mit den natürlichen Antigenen L und C verglichen etwas günstigere Resultate als dieselben gab. So z. B. notierten wir:

- I. Serie (Ant. L) 24 Proben: 3 divergent — 2 zugunsten unseres S.-R.,  
1 zugunsten des natürlichen Antigens,
- II. Serie (Ant. C) 62 Proben: 9 divergent — 6 zugunsten unseres S.-R.,  
3 zugunsten des natürlichen Antigens.

Dieser Eindruck wird auch durch den unmittelbaren Vergleich der Ergebnisse bestätigt, welche in denselben Proben mit den 2 künstlichen Antigenen (dem Frankfurter und dem unserigen) erhalten wurden. Unter 59 solchen Proben erhielten wir 8 nicht übereinstimmende Resultate, von welchen 2 zugunsten des Original-Antigens und 6 zugunsten des von uns hergestellten ausfielen.

Es ist vielleicht zulässig, die Ursache dieses Unterschiedes darin zu suchen, daß unser Antigen frisch bereitet war; das Original-Antigen von Sachs und Rondoni dagegen längere Zeit aufbewahrt wurde. Diese günstigen von uns erhaltenen Ergebnisse stimmen gut mit Facchinis Untersuchungen überein, welcher 4mal das künstliche Antigen A bereitet hat und immer übereinstimmende Resultate mit dem Sachsschen Original-Antigen erhielt. Dagegen können wir uns einstweilen die ungünstigen Resultate nicht erklären, welche Rajchman und Szymanowski mit einem von ihnen nach Sachs und Rondoni hergestellten künstlichen Antigen erhalten haben.

Wenn wir nun ein allgemeines Urteil über das künstliche Antigen von Sachs und Rondoni abgeben sollen, müssen wir vor allem bemerken, daß uns in keinem einzigen Fall ein gesundes Serum eine Hemmung der Hämolyse gab. Nur in einem Fall von Malaria bei einem 15-jährigen Mädchen sahen wir im ersten Röhrchen mit künstlichem Antigen eine teilweise Hemmung der Hämolyse, wogegen mit natürlichem Antigen ein gänzlich negatives Resultat notiert wurde. Es zeigt sich also das Antigen von Sachs und Rondoni im Gegensatz zu allen seinen künstlichen Vorläufern sowohl in unseren Versuchen, wie auch bei Sachs und Rondoni und bei Facchini als streng spezifisch.

Was die Empfindlichkeit der künstlichen Antigene anbelangt, so zeigte sie sich in vielen Fällen größer als diejenige der natürlichen Antigene, indem bei manchemluetischen Individuum eine teilweise oder gänzliche Hemmung dort notiert wurde, wo das natürliche Antigen ein negatives Resultat gab. Die anscheinend hohe Zahl der nicht übereinstimmenden Resultate, die oben zitiert wurde, spricht nicht so sehr gegen das künstliche Antigen, wenn man bedenkt, daß wir bei der Schätzung der Unterschiede sehr streng vorgehen und selbst kleine quantitative Unterschiede notierten, daß weiter die Divergenz zum großen Teil gerade zugunsten des S.-R. Antigens spricht, daß endlich in vielen Fällen, welche wir zu den übereinstimmenden gerechnet haben, der allgemeine Eindruck, in Ziffern nicht faßbar, ebenfalls zugunsten des künstlichen Antigens ausfiel.

Wir müssen uns also übereinstimmend mit Facchini dahin aussprechen, daß das Bestreben von Sachs und Rondoni uns der definitiven Lösung der Aufgabe, welche sich die Autoren gestellt haben, bedeutend nähert, wenn es auch dieselbe endgültig noch nicht löst. Wir brauchen wohl nach dem oben Gesagten nicht zu wiederholen, daß die Herstellung eines absolut spezifischen und genügend empfindlichen künstlichen Antigens einen bedeutenden Fortschritt in der Wassermannschen Reaktion bedeuten würde. Die Reaktion würde dadurch leichter zugänglich und besser vergleichbar, etwa so wie die Widalsche Probe durch das Fickersche Diagnostikum.

Wenn wir trotz der sehr günstigen Erfolge, welche wir mit den künstlichen Antigenen erhalten haben, doch der Meinung sind, daß der Versuch von Sachs und Rondoni sich der definitiven Lösung erst nähert — so tun wir es deshalb, weil sich die natürlichen Antigene sowohl bei Sachs und Rondoni wie auch bei Facchini doch etwas empfindlicher zeigten als die künstlichen. Auch in unseren Experimenten war das Antigen C etwas empfindlicher — wenigstens im Vergleich mit dem Original-Antigen von Sachs und Rondoni. Wir glauben also, daß man durch weitere, wahrscheinlich unbedeutende Modifikationen das künstliche Antigen vervollkommen sollte, bis es den Grad der Empfindlichkeit der besten natürlichen Antigene erreicht.

Das künstliche Antigen, und zwar sowohl das Original als auch das von uns hergestellte, zeigte sich in unseren Experimenten — übereinstimmend mit Facchini und entgegen Sachs und Rondoni — hämolytisch für Hammelblutkörperchen, und zwar sowohl allein als auch kombiniert mit Komplement. Facchini meint nun, daß die Oleinsäure, welche keine komplementbindenden Eigenschaften aufweist und dabei hämolytisch wirkt, im künstlichen Sachsschen Antigen überflüssig, wenn nicht schädlich ist.

Wir haben nun, darauf fußend, ein künstliches Antigen ohne Oleinsäure nach folgender Formel hergestellt:

2,5 g Lecithin (ex ovo Merck)  
2,5 „ Natr. Olein. Kahlbaum  
1000 ccm Alkohol.

Es wird ebenso wie das S.-R. bereitet. Um der Abwesenheit der Oleinsäure zu steuern, haben wir dieses Antigen in 3-facher (anstatt 5-facher) Emulsion benutzt.

Später benutzten wir ein Antigen nach folgender Formel:

0,1 g Lecithin  
0,1 „ Natr. Olein.  
25 ccm Alkohol,

und zwar in einer 5-fachen Emulsion, wodurch derselbe Gehalt an aktiven Körpern, wie in der vorigen Mischung, erhalten wird. Auch dieses Antigen wirkt hämolytisch sowohl allein wie zusammen mit Komplement. Mit diesem Antigen haben wir 48 vergleichende Proben ausgeführt: 37 gaben ein übereinstimmendes und 11 ein nicht übereinstimmendes Ergebnis. Von diesen 11 waren 9 grundsätzlich verschieden, und zwar 7 zugunsten des unseren und 2 zugunsten des natürlichen Antigens. In 2 Proben waren die Resultate nur quantitativ verschieden, und zwar zugunsten des natürlichen Antigens. Der oben angeführte Fall von Malaria gab mit diesem Antigen eine vollkommene Hemmung. (Siehe die Befunde von Much und Eichelberg.) Ein Vergleich dieses Antigens mit dem Original-Antigen von Sachs und mit unserem nach Sachs und Rondoni hergestellten zeigte, daß es etwas empfindlicher ist als das Original-Antigen und sich dem unserigen nähert. Deshalb halten wir auch diese unsere Probe, trotz ihrer relativ günstigen Erfolge, nicht für eine definitive Lösung des Problems der künstlichen Antigene.

Es wird wohl hier am Platz sein, zu erwähnen, daß Sachs und Rondoni in ihren Voruntersuchungen ebenfalls ein Antigen, bestehend aus Lecithin und Seife zu gleichen Teilen, verwendet haben; die damit erhaltenen Resultate waren wohl spezifisch, aber nicht empfindlich genug, um praktische Verwertung finden zu können. Woran der Unterschied zwischen diesen Ergebnissen und den letztthin erwähnten unserigen liegt, vermögen wir vorderhand nicht anzugeben, da Sachs und Rondoni die Mengenverhältnisse dieses Gemisches nicht genauer angeben; wenn die Konzentration von Lecithin und Seife darin dieselbe war wie im definitiven Gemisch A, könnte man vielleicht die Konzentrationsunterschiede (4 ‰ statt 2,5 ‰) dafür verantwortlich machen.

Wie schon oben erwähnt wurde, haben wir außer der klassischen Wassermannschen Probe auch die Bauersche als Kontrolle der Versuche mit künstlichen Antigenen herangezogen. Folgende Tabelle veranschaulicht die dabei erhaltenen Resultate:

Tabelle III.

Antigen	Anzahl der Proben	Different	Zugunsten der Bauerschen Modifikation	Zugunsten des künstlichen Antigens	Nicht verwendbar
S.-R. Or.	74	3	1	2	23
Unser S.-R.	58	6	2	4	13
S.-R. ohne Oleinsäure	42	8	2	6	10
Zusammen	174	17	5	12	46

Die in der letzten Kolonne enthaltenen Zahlen bedeuten jene Bauerschen Proben, deren Resultate wegen gehemmter Kontrolle nicht verwendbar erscheinen. Ebenso wie angesichts der klassischen Wassermannschen Probe haben auch hier die künstlichen Antigene eine gewisse Ueberlegenheit an den Tag gelegt.

Nebenher wollen wir bemerken, daß die Sera von 5 Leuten, die soeben eine regelrechte Wutschutzimpfung nach Pasteur'scher Methode durchgemacht hatten, vollkommen negative Reaktion gaben, entgegen einer in der Literatur vorgefundenen Behauptung.

Wenn wir nun alle unsere Versuche, die mit den drei künstlichen Antigenen angestellt wurden, überblicken, sehen wir, daß auf 267 Proben 228 ganz übereinstimmende (= 85,4 Proz.), 39 = 14,6 Proz. teilweise oder gänzlich divergierende Resultate kommen, darunter 14 = 5,2 Proz., die zugunsten der natürlichen, 25 = 9,4 Proz., die zugunsten der künstlichen Antigene sprechen. Trotz dieses für die künstlichen Antigene günstigen Ergebnisses wollen wir durchaus nicht behaupten, daß dieselben bereits in ihrer jetzigen Form besser sind, als die natürlichen, glauben aber auf Grund der Arbeiten von Sachs und Rondoni, Facchini, sowie unserer eigenen Untersuchungen, daß die Divergenzen der Resultate zwischen den künstlichen und den natürlichen Antigenen nicht größer sind, als diejenigen,

die verschiedene natürliche Antigene untereinander aufweisen können.

Nicht unerwähnt mag bleiben, daß das Ideal der Einheitlichkeit und Stabilität, das den Hauptzweck der künstlichen Antigene bildet, noch immer nicht erreicht ist. Die Differenzen, die sich bei Verwendung des S.-R. Or., sowie des von uns bereiteten ergeben, verdienen gewiß berücksichtigt zu werden. Wenn diese Unterschiede — wie wir geneigt sind anzunehmen — von der Dauer der Aufbewahrung der Antigene abhängen, wird man bei einer ausgedehnteren praktischen Verwendung der künstlichen Ersatzmittel mit diesem Umstand zu rechnen haben. Es wird alsdann nötig sein, durch besondere Untersuchungen festzustellen, wie lange Zeit und unter welchen Umständen das künstliche Antigen seine Empfindlichkeit unverändert bewahrt. Auch ist es möglich, daß das Alter und der Zustand der zur Bereitung der Gemische verwendeten chemischen Substanzen (vor allem des Lecithins als eines recht labilen Körpers) die Aktivität und Stabilität der Gemische beeinflussen. Zwecks Sicherung der Konstanz der künstlichen Antigene wäre es wohl am ratsamsten, wenn eine größere und vertrauenswürdige chemische Fabrik ihre Herstellung in größerem Maßstab übernehmen würde, wie es z. B. mit dem Fickerschen Diagnostikum der Fall war.

Außer den bisher besprochenen praktischen Vorteilen, die das Ersetzen der natürlichen Antigene durch ein künstliches bieten könnte, verdient wohl auch die theoretische Bedeutung dieser Befunde berücksichtigt zu werden. Die Möglichkeit, die Extrakte aus luetischen Organen durch solche aus normalen zu ersetzen, nahm der Wassermannschen Reaktion, den Charakter der strikten Spezifität, indem sie zeigte, daß das in den luetischen Extrakten aktive Agens kein Spirochäten-derivat ist. Andererseits beweist die Einführung der alkoholischen Extrakte an Stelle der wässerigen, daß hier überhaupt keine eiweißartigen Körper in Betracht kommen, als welche wir bis jetzt die bakteriellen Antigene zu betrachten gewohnt waren, sondern alkohollösliche Substanzen, speziell Lipide. Die mit Aufschwemmungen verschiedener Lipide unternommenen Versuche schienen durch die mangelhafte Spezifität ihrer Resultate dafür zu sprechen, daß den Organ-

extrakten doch eine gewisse Spezifität zukommt. Nun zeigen aber die mit künstlichen Antigenen erhaltenen Resultate, daß wohldefinierte chemische Körper in gewissen Kombinationen Reaktionen geben können, die denjenigen mit natürlichem Antigen durchaus nicht nachstehen. Auch sprechen sie dafür, daß die Spezifität der natürlichen Extrakte wahrscheinlich auf bestimmten relativen Mengenverhältnissen der in ihnen enthaltenen Lipoide (und Gallensalze) beruht, um so mehr, wenn man bedenkt, daß das Lecithin ein normaler Bestandteil fast aller Organe ist und daß von Beneke in luetischen Lebern erhebliche Mengen von Seifen nachgewiesen wurden. Man könnte auch annehmen, daß der verschiedene Grad des (durch Erkrankung verursachten oder postmortalen) Abbaues der luetischen Lebern auch verschiedene relative und absolute Mengenverhältnisse der extrahierten Lipoide bedingt und dadurch für den ungleichen Wert verschiedener luetischer Extrakte einen wichtigen Faktor abgibt. Es liegt uns natürlich fern, zu denken, daß die relativen Mengenverhältnisse der aktiven Körper in diesen natürlichen Extrakten genau dieselben sein müssen, wie im künstlichen Gemisch von Sachs und Rondoni, es ist vielmehr ganz gut denkbar, daß dieselben Körper (oder selbst nur verwandte) in verschiedenen Mischungsverhältnissen gleich günstige oder sogar günstigere Resultate geben können. Jedenfalls wird man hoffen dürfen, daß weitere Untersuchungen mit den künstlichen Antigenen nicht nur nach der praktischen Seite hin zur Vervollkommnung der Wassermannschen Reaktion beitragen werden, sondern auch zur Lüftung des Schleiers, der noch immer das Wesen dieses interessanten Phänomens verdeckt.

#### Zusammenfassung.

- 1) Das Antigen von Sachs und Rondoni ist streng spezifisch.
- 2) Seine Empfindlichkeit ist derjenigen der natürlichen Antigene fast gleich.
- 3) Bezüglich der Einheitlichkeit und Haltbarkeit läßt sich ein abschließendes Urteil noch nicht abgeben.



4) Das künstliche Antigen ohne Oleinsäure kommt demjenigen von Sachs und Rondoni an Spezifität und Empfindlichkeit gleich.

5) Die Spezifität derluetischen Leberextrakte scheint auf bestimmten Mengenverhältnissen darin enthaltener chemisch definierter Körper (Lipoide, gallensaure Salze) zu beruhen.

#### Literatur.

- Beneke, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 15.  
 Bruck und Cohn, Ibid., p. 2268.  
 Elias, Neubauer, Porges und Salomon, Wien. klin. Wochenschr., 1908, No. 21—23.  
 Facchini, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Orig., Bd. 2, Heft 3, p. 257—304.  
 Halberstaedter, Müller und Reiche, Berl. klin. Wochenschr., 1908, p. 1917.  
 Rajchman und Szymanowski, Przegląd lek., 1909, p. 387.  
 Sachs und Rondoni, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Orig., Bd. 1, Heft 1, p. 132—151.  
 Seligmann, Ibid., Orig., Bd. 1, Heft 2, p. 340.  
 Seligmann und Klopstock, Berl. klin. Wochenschr., 1908, p. 1719.  
 Taege, Münch. med. Wochenschr., 1908, p. 1730—1733.

---

*Nachdruck verboten.*

Aus den Lungenheilstätten Beelitz der Landesversicherung Berlin  
 (Chefarzt Dr. Pickert).]

### Ueber das Verhalten der Eiterzellen verschiedener Herkunft gegenüber den Tuberkelbacillen.

Von Dr. med. **E. Löwenstein**,  
 ärztlichem Abteilungsdirigenten.

Mit 1 Figur im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. Juli 1909.)

Zum Studium der Phagocytose hat man bisher nur die Leukocyten gesunder Tiere benutzt: der durch eine 3-proz. Aleuronatinjektion erzielte Eiter wurde aus der Brust- bzw. Bauchhöhle mittels physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zum Versuch verwendet.

Beim Versuch mit menschlichen Leukocyten sind aber ausschließlich Blutleukocyten in Verwendung gekommen. Für die Methodik hierbei war nahezu ausschließlich die von Wright vorgeschlagene Technik maßgebend.

Aus dem Verhalten der Blutleukocyten ist aber sicherlich kein Schluß auf die Vorgänge im Krankheitsherd, auf das Verhalten der Eiterzellen gegenüber den Krankheitserregern gestattet. Der Verf. war der erste, der direkt mit dem Eiter aus dem Krankheitsherd Versuche über Phagocytose angestellt hat. Diese Methode bietet, ganz abgesehen von ihrer Fragestellung, auch technische Vorteile, da der Zusatz eines die Gerinnung verzögernden Agens überflüssig ist. Es ist jeder Eiter dazu verwendbar, bei welchem die Eiterzellen noch lebensfähig sind.

Als ein vorzügliches Versuchsmaterial erwies sich der Eiter eines Falls von Blasen tuberkulose: das Sediment enthielt zahllose Leukocyten, sehr viele Erythrocyten, Blutgerinnsel und spärliche Blasenepithelien. Die Zahl der Tuberkelbacillen war sehr groß, da man fast in jedem dritten Gesichtsfeld ein Nest schlanker, parallel geordneter Stäbchen antraf, die stets extracellulär gelegen waren. Mit diesem Eitermaterial ließ sich außerordentlich leicht arbeiten.

Es erhob sich nun sofort die Frage: Sind diese Leukocyten, die direkt aus einem tuberkulösen Herde stammen, fähig, in vitro zugesetzte Tuberkelbacillen in sich aufzunehmen?

Eine Reihe von Versuchen ergab übereinstimmend, daß die Leukocyten des tuberkulösen Blasen eiters Tuberkelbacillen aufnehmen können; besonders schön trat die Phagocytose in Erscheinung, wenn man dem Eiter  $\frac{1}{10}$  ccm Blutserum desselben Patienten zugesetzt hatte: dann beteiligten sich rund 50 Proz. der Eiterzellen an der Phagocytose.

Es ist also Tatsache, daß die Eiterzellen, die aus einem tuberkulösen Herde stammen und dort keine Tuberkelbacillen in sich aufgenommen haben, in vitro frisch zugesetzte Tuberkelbacillen in großem Umfange phagocytieren.

Daraus hat der Verf. den Schluß gezogen, daß die Bedingungen für die Phagocytose in vitro und in vivo verschiedene sind. Auf den Einwand Löhleins, daß diese „ja recht merkwürdige Erscheinung“ „zu den herrschenden Anschauungen und bisherigen tatsächlichen Feststellungen über die Rolle der Leukocyten bei der Phagocytose freilich nicht passe“, habe ich als einzige Antwort meine Versuche nur noch weiter ausgedehnt.

Zuerst verwendete ich Eiter der verschiedensten Provenienz zu Phagocytoseversuchen und in allen Fällen trat Phagocytose der Tuberkelbacillen auf, in denen die Leukocyten noch am Leben waren.

Die schönsten Resultate erhält man mit Gonokokkeneiter.



Fig. 1. Tuberkelbacillen, von gonokokkenhaltenden Eiterzellen aufgenommen.

Setzt man zu frisch aus der Urethra gestrichenem Eiter Tuberkelbacillen zu, so tritt schon nach 15 Minuten eine Phagocytose auf. Schwemmt man aber die Tuberkelbacillen in menschlichem Serum auf, am besten in solchem, das von tuberkulinbehandelten Patienten herrührt, so beteiligen sich die Mehrzahl der Eiterzellen an der Phagocytose. Selbst

Eiterkörperchen, die schon Gonokokken in sich eingeschlossen haben, sind noch imstande, Tuberkelbacillen in sich aufzunehmen, wie das Photogramm beweist.

Hingegen habe ich bei Eiterzellen, die Staphylokokken gefressen hatten, keine Phagocytose gesehen.

Ueber diese Versuche, mit Eiter der verschiedensten Herkunft Phagocytose zu erzielen, wird demnächst ausführlicher berichtet werden.

Hier seien nur noch einzelne Versuche mit tuberkulösem Lungeneiter erwähnt. Homogenisiert man rein eitriges Sputum, das Tuberkelbacillen enthält, durch 5 Minuten dauerndes Schütteln mit Porzellanschrot, fügt in Menschenserum aufgeschwemmte Tuberkelbacillen hinzu, schüttelt dann wieder wenigstens 5 Minuten, so sieht man nach 15—30 Minuten Beobachtung im Brutschrank eine so intensive Phagocytose auftreten, wie man sie nur höchst selten im Auswurf findet.

Zu diesen Versuchen sind stets nur solche Sputa ausgewählt worden, bei denen sich extracelluläre Lagerung gefunden hatte. Man kann aber auch Sputa mit intracellulär plazierten Tuberkelbacillen verwenden, denn der Unterschied zwischen der Phagocytose in vivo und in vitro ist ein so enormer, daß auch ein solcher Versuch noch überzeugend wirkt.

Auf die Phagocytose im Krankheitsherd hat der Verf. seit 1905 sein Augenmerk gerichtet und wiederholt auf ihr Vorkommen im tuberkulösen Auswurf hingewiesen<sup>1)</sup>. Schon 1907 hat Verf. hervorgehoben: „Am seltensten sind die Fälle, bei denen fast alle Bacillen intracellulär und nur sehr wenige frei zwischen den Zellen gelagert sind. In der Regel ist aber die Zahl der Phagocytosen in reinem Ausstrichpräparat nicht so groß, sondern es bedarf einer aufmerksamen Musterung des Präparates und häufiger Einzeluntersuchungen, um zu einem sicheren Urteil zu kommen.“

Seit dieser Zeit habe ich in Gemeinschaft mit Herrn Oberarzt Dr. Assmann diese Untersuchungen fortgesetzt. Die Zahl der Fälle, bei denen wir eine intracelluläre Lagerung gefunden haben, dürfte mit 5—10 Proz. der offenen Tuberkulösen unseres Heilstättenmaterials richtig veranschlagt sein. In erster Linie finden wir bei lange bestehenden ulcerösen Phthisen (Kavernen), zweitens bei längere Zeit spezifisch Behandelten am Ende der Behandlung die intracelluläre Lagerung. Aber auch in diesen Fällen ist die Zahl der freiliegenden Bacillen unendlich vielemal größer als die der intracellulär gelegenen Bacillen. Wenn man den Eindruck über das Zahlen-

1) Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten, 1906; Zeitschr. f. Tuberkulose und Heilstättenwesen, 1906; Deutsche med. Wochenschr., 1907.

verhältnis einer Schätzung wiedergeben darf, so wird man höchstens nach unten fehlgehen mit der Annahme, daß in der Regel kaum der millionste Teil der ausgehusteten Bacillen von Phagocyten aufgenommen ist.

Deshalb ist der Schluß unvermeidlich, daß die Phagocytose bei der Tuberkulose in vitro eine ganz andere Bedeutung hat als in vivo. Im Krankheitsherd erreicht sie einen so geringen Grad, daß sie für den Verlauf der Infektion höchstens eine symptomatische Bedeutung gewinnen kann.

Zweifellos spricht ja der Schein dafür, daß die Hauptrolle der Eiterzellen in der Phagocytose zu suchen ist.

Die Bedenken gegen die Phagocytose als Hauptrolle der Eiterzellen werden aber noch gewichtiger, wenn man ihre Teilnahme am Entwicklungsgang der Tuberkel verfolgt. Das „Eingreifen“ bzw. Einwandern der Leukocyten erfolgt nicht sofort nach der Niederlassung der Tuberkelbacillen, sondern erst nach dem Zugrundegehen der fixen Gewebszellen (Baumgarten). Die eigentliche Aktion der Leukocyten setzt sogar erst ein, wenn der Tuberkel seinen Höhepunkt überschritten hat und der Degeneration zuneigt. Schon aus dem zeitlichen Auftreten der Leukocyten muß man schließen, daß die nativen, nicht sensibilisierten Tuberkelbacillen keine positive chemotaktische Wirkung ausüben können. Erst in der zweiten Entwicklungsperiode des Tuberkels kommt es zu einer „typischen entzündlichen Extravasation farbloser Blutzellen, welche die bisher ausschließlich oder fast ausschließlich aus epitheloiden Elementen zusammengesetzten Tuberkelknötchen mit Leukocyten versieht“ (Baumgarten). Jetzt erst beim Einwandern der Leukocyten in die Tuberkel, bei der „Vereiterung der Tuberkel“ (Ackermann, Kromayer) ist den Leukocyten Gelegenheit gegeben, unter gewissen Bedingungen Tuberkelbacillen aufzunehmen.

Der Angriffspunkt der Leukocyten ist also nicht der Tuberkelbacillus, sondern die durch die Tuberkelbacillen nekrotisierten fixen Gewebszellen.

Da die Leukocyten die Tuberkelbacillen aber nicht abtöten können, so ist es für den Organismus die weitaus wirksamste

Verteidigung, wenn er seinen Leukocytenapparat zur Zerstörung und Entfernung des ganzen Krankheitsherdes konzentriert.

Es liegen also auch hier die Versuchsbedingungen *in vivo* und *in vitro* völlig verschieden. Und sicherlich wird man dasselbe Verhalten der Leukocyten auch bei anderen Infektionen beobachten können. Metschnikoff selbst sagt in der Vorrede zum Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung (p. 12): „Es ist Tatsache, daß sich Leukocyten *in vitro* anders verhalten können, als im lebenden Organismus. Wir haben oft gesehen, daß in physiologischer Kochsalzlösung suspendierte Leukocyten der Meerschweinchen massenhaft die virulentesten, aus dem Blute stammenden Milzbrandbacillen aufnahmen, während im Meerschweinchenkörper keine Spur von Phagocytose zu beobachten war.“

„Die angeführten Beispiele mögen genügen, um zu zeigen, daß das Hauptprinzip der Methodik resp. der Technik der Untersuchungen über die Immunität darin bestehen muß, die Vorgänge im lebenden Organismus stets im Auge zu behalten und nie daran zu gehen, die Erscheinungen *in vitro* sofort auf die Verhältnisse im Tierkörper zu übertragen.“

#### Zusammenfassung.

1) Für den natürlichen Verlauf der Infektion mit Tuberkulose ist der Teil der Tätigkeit der Leukocyten, welcher als Phagocytose in Erscheinung tritt, von untergeordneter Bedeutung.

2) *In vitro* gelingt es sehr leicht, Eiterzellen der verschiedensten Herkunft zur Aufnahme von Tuberkelbacillen zu veranlassen.

Auch Eiterzellen aus tuberkulösen Herden, in denen man keine intracelluläre Lagerung findet, ja sogar Eiterzellen, die bereits Gonokokken phagocytiert haben, sind dazu imstande.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

**Ueber die Brauchbarkeit der Porgesschen Ausflockungsreaktion für die Diagnose der Lues an Leichen.**

Von Dr. **M. Laub** und Reg.-Arzt Dr. **J. Novotný**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. Juli 1909.)

Das Studium des Mechanismus der Wassermannschen Reaktion der Serodiagnose der Lues führte notwendigerweise zu einer Aenderung ihrer Auffassung als Antigen-Antikörperbindung, da es sich gezeigt hatte, daß die wirksame Substanz des als Antigen benutzten Extraktes aus der Leber eines syphilitischen Fötus mit gleich gutem Erfolge durch Extrakte aus anderen normalen oder pathologischen Geweben ersetzt werden konnte (Marie und Levaditi, Landsteiner, Müller und Pötzl). Unabhängig voneinander und fast gleichzeitig haben Porges und Landsteiner, Müller und Pötzl den Nachweis erbracht, daß der wirksame Bestandteil eines wirksamen Extraktes ausluetischer Fötusleber zum größten Teil der alkohollöslichen Fraktion angehöre und wahrscheinlich ein Lipoid sei. Darauf beruhen die Bestrebungen von Porges, das für die Praxis immerhin komplizierte Wassermann-Bruck-Neisser'sche Verfahren zu vereinfachen, das Serum Luetischer durch eine Lipoidaufschwemmung auszufällen. Im Vereine mit Meier versuchte Porges zunächst eine Lecithinemulsion zur Ausflockung, kam jedoch, da sich diese Methode nicht als spezifisch erwies, nicht zum Ziele. Da aber auch andere hydrophile Kolloide mit Seris Luetischer Ausflockung gaben, so wählten Elias, Neubauer, Porges und Salomon das Natrium glycocholicum als Reagens für Luessera. Nach Ansicht von Porges erfüllt die Reaktion mit Natrium glycocholicum alle Anforderungen, die man billigerweise stellen kann, sowohl hinsichtlich der Spezifizität als auch hinsichtlich der Häufigkeit bei Luesfällen, so daß er nicht an-

steht, sie diesbezüglich als mindestens gleichwertig mit der Komplementbindung zu bezeichnen.

Ueber ihre Brauchbarkeit liegen bisher nur spärliche Mitteilungen vor.

Fritz und Kren haben 85 Fälle, 59 Luetiker und 26 nichtluetisch Infizierte untersucht. In 65 Proz. der Fälle von klinisch manifester Lues fanden sie Ausflockung bei Anwendung von glycocholsaurem Natron; dieser Prozentsatz sinkt jedoch für die Latenzperiode noch weiter. Da aber 18 Proz. der zur Kontrolle untersuchten Sera Nichtluetischer (Tuberkulose) ebenfalls Ausflockung zeigten, so „scheint wohl das glycocholsaure Natron mit der Klinik besser übereinstimmende Resultate zu geben als das Lecithin; immerhin sind auch die Ergebnisse mit diesem Reagens keine befriedigenden“.

Bauer und Meier anerkennen das hohe wissenschaftliche Interesse, daß der Ausflockungsmethode zukommt, halten aber dafür, daß sie einstweilen nicht imstande ist, die Komplementbindungsmethode zu ersetzen.

Russ hat bei 111 Luetischen und 20 Nichtluetischen Paralleluntersuchungen nach Wassermann und Porges ausgeführt und kam zu dem nicht ungünstigen Resultate, daß sämtliche Nichtluetische sowohl nach Wassermann als auch nach Porges negativ reagierten. Er ist der Meinung, daß die Porgessche Reaktion wohl nur bei Luetischen einen positiven Ausfall gibt, aber weit weniger empfindlich ist als die Wassermannsche und gerade in jenen Fällen versagt (spätlatentes oder symptomfreies Stadium der Lues oder metaluetische Erkrankungen), wo ihr positiver Ausfall von besonderer diagnostischer Bedeutung wäre.

In jüngster Zeit berichtete Schwarzwald über seine Untersuchungen, die 65 Fälle von Luetikern mit klinisch beobachteten Manifestationen und 133 zur Kontrolle herangezogene Nichtluetische umfassen. Bei den letzteren ergab die Prüfung der Reaktion in allen Fällen bis auf 3 ein negatives Resultat, von den Luetischen zeigten 41 Fälle (ca. 63 Proz.) positive, 24 Fälle (ca. 37 Proz.) negative Reaktion, In 39 Fällen wurde Leichenserum bei der Ausführung der



Probe gebraucht. Eine Anzahl dieser Seren fiel jedoch für die Beurteilung der Reaktion weg, da sie bei der Inaktivierung trübe wurden und daher eine eintretende Ausflockung nicht mehr deutlich wahrnehmen ließen. Die Reaktion war in einem Falle von Aorteninsuffizienz nur angedeutet, in einem Tabesfalle positiv und unter 10 Fällen von Heller-scher Aortitis reagierten 3 positiv, während die übrigen keine Ausflockung zeigten. Schwarzwald kommt zu dem Schlusse, daß dem positiven Ausfalle der Reaktion große Beweiskraft zuzuschreiben sei und nur bei ihrem negativen Ausfalle noch die Wassermannsche als die feinere ausgeführt werden solle.

Ehe noch die Erfahrungen dieser Autoren mitgeteilt wurden, hatten wir, um zu einem Urteile über den Wert der im Hinblick auf die Einfachheit der Ausführung eventuell sehr wertvollen Porgesschen Ausflockungsreaktion für die Diagnose der Lues zu gelangen, auf Veranlassung des Herrn Prof. R. Kraus im Anschlusse an unsere Untersuchungen über die komplementbindenden Substanzen bei Tuberkulose<sup>1)</sup> an einer größeren Zahl von Seren — in erster Linie Leichenseran — Paralleluntersuchungen nach Porges und nach Wassermann ausgeführt. Wie aus den Untersuchungen von Löhlein, Fränkel und Much, Pick und Proskauer sowie jüngst von Seligmann und Blume hervorgeht, hat sich die Wassermannsche Reaktion nicht nur in der Diagnose der Lues bei Lebenden, sondern auch bei Seren von Leichen bewährt. Diese Autoren sehen in der Wassermannschen Komplementbindungsmethode bei Lues trotz des Versagens in einzelnen Fällen eine wertvolle Ergänzung für die pathologisch-anatomische Untersuchung und anerkennen auch hier ihre große diagnostische Bedeutung. Aus diesem Grunde glaubten wir durch unsere Paralleluntersuchungen ein Urteil über den Wert der Porgesschen Reaktion zu gewinnen, allerdings in der Voraussetzung, daß ebenso wie bei der Reaktion nach Wassermann auch bei der nach Porges die spezifische Substanz in den Seren von Leichen vorhanden ist.

1) Wiener klin. Wochenschr., 1909, No. 31.

In der Methodik hielten wir uns strenge an die von Porges angegebenen Vorschriften und verwendeten zur Untersuchung stets bei 56° inaktivierte Sera.

Die von Schwarzwald oft als störend konstatierte Trübung der Leichensera durch Inaktivierung, trat bei unseren Untersuchungen nur in ganz vereinzelt Fällen auf.

Es wurden von uns im ganzen 136 Fälle untersucht: von diesen betrafen 98 Leichensera, während die übrigen 38 von Kranken (Lebenden) herrührten<sup>1)</sup>. Von diesen zeigten 10 Fälle Symptome einer manifesten Lues, 10 Fälle waren Phthisiker, die übrigen litten an verschiedenen Krankheiten. Bei den 10 Luesfällen fiel die Wassermannsche Reaktion positiv aus, während die Reaktion nach Porges in 5 Fällen versagte. Weiter zeigten 3 Fälle von Tuberkulose bei negativem Wassermann deutliche Ausflockungsreaktion.

Unter den 98 untersuchten Leichenseren gaben acht Fälle übereinstimmend nach Porges und Wassermann positive Reaktion.

Unter diesen ist ein Fall von Arteriitis mit Verengung der Coronararterien und Insuffizienz der Aortenklappen bemerkenswert.

Hingegen reagierten nach Porges positiv, nach Wassermann negativ 21 Fälle.

Diese betrafen folgende Krankheiten:

- 1) Sarcoma hepatis.
- 2) Endart. chron. def. Aort. et arteriar.
- 3) Pneumonie, Endart. chron. def.
- 4) Arteriosclerosis, Embol. art. F. Sylv. d.
- 5) Carcinoma uteri.
- 6) Endocard. chron. valv. Mitr. c. insuff.
- 7) Emphysema pulmonum.
- 8) Haemorrhag. cerebri, Atrophia ren. c. Morb. Bright. chr., Hypertrophia cordis et Arteriitis def. Aort. et arteriar.
- 9) Carcinoma ventriculi.
- 10) Carcinoma proc. vermif. et intest. coeci exulc. et gangraen. c. perf. intest. et perit. diff.

1) 20 Fälle verdanken wir der Liebenswürdigkeit der Herren Dozenten Dr. S. Grosz und Dr. R. Volk.

- 11) Stenosis et Insuff. valv. Mitr. et Aort.
- 12) Insuff. valv. Mitr.
- 13) Leukaemia acula.
- 14) Carcinoma hepatis, Icterus gravis.
- 15) Anaemia acut. et Haemorrh. art. coron. ventriculi sin. sup., Insuff. valv. Aort. et Arterioscl.
- 16) Carcinoma intestini.
- 17) Endocard. chron., Insuff. v. Mitr.
- 18) Concretio cord. c Pericard. et Arteriitis chron.
- 19) Morb. Bright. chr. recrudescens. Endart. chron. def. Aort. et arteriar.
- 20) Carcinoma ventriculi.
- 21) Endocarditis chr. Mitr. et Stenosis ostii ven. sin. et Insuff. v. Tricuspid. et valv. Aort. c. Insuff., Endart. chr. def. Aort. et arteriar. gravis.

In dieser Gruppe finden sich 8 Fälle von Gefäßerkrankungen, deren Aetiologie in Hinblick auf die Untersuchungen Chiaris, Hellers u. a. strittig ist. Seligmann und Blume hatten bei 8 Fällen von Mesoarthritis productiva positive Wassermannsche Reaktion gefunden. Ob in der Aetiologie unserer Fälle Lues ebenfalls eine Rolle spielt, müssen wir dahingestellt sein lassen. Der negative Ausfall der Wassermannschen Reaktion spricht ebensowenig gegen Lues, als für die positive Ausflockungsreaktion mit Rücksicht auf die in derselben Gruppe verzeichneten 13 Fälle anderer, zumeist nicht nachweisbarerluetischer Erkrankungen, Syphilis als ätiologisches Moment herangezogen werden kann.

In Hinblick auf die zuerst von Stumme konstatierte, dann auch von anderen Autoren (Weil und Braun, Schenk) bestätigte lecithinausflockende Eigenschaft solcher Sera, die von malignen Tumoren herrühren, sei auch der positive Ausfall der Reaktion mit glycocholsaurem Natron in 7 Fällen hervorgehoben, die ebenfalls maligne Neubildungen betreffen.

Bei 4 Fällen fiel die Porgessche Reaktion negativ aus, während die Reaktion nach Wassermann positiv war.

Die pathologisch-anatomische Untersuchung ergab folgendes:

Fall 1. Endocarditis chron., Icterus universalis.

Fall 2. Peritonitis fibrin. et Paralysis intestini et appendicit. perforat., Pneum. lobul. bil. confl.

Fall 3. Atrophia cerebri, Incrassatio leptomeningum, Granulationes ependymatis (Paral. progr.), Concretio cordis cum pericardis, Endarteriitis chron. deformans, Aortae et arteriarum etc.

Fall 4. Endarteriitis obliterans arter. vertebral sinistr. et art. basil. dimid. posteriori luetica cum thromb. art. basil. subsequente encephalomalacia recenti pontis Varoli, Incrassatio diffusa leptomeningum, Granulationes ependymatis, Oedema cerebri, Aortitis chronica, Obesitas univ., Carcinoma apicis process. vermiform.

Eine nähere Beachtung verdienen insbesondere Fall 3 und Fall 4, und zwar deswegen, weil sowohl die klinische als auch die anatomische Untersuchung den Verdacht auf Lues erregten. Bei Fall 3 handelte es sich um eine progressive Paralyse, während bei Fall 4 der Obduzent, Herr Hofrat Paltauf, Lues als ätiologisches Moment für die Veränderungen der Gefäße als sehr wahrscheinlich annahm.

Aus dem Befunde ist bemerkenswert der Passus über das Verhalten der Gefäße: . . . . Die Art. vertebral. dextr. hellgelb, starrer, in ihrer Wand verdickt. Diese Verfärbung und Wandverdickung setzt sich auch auf die hintere Hälfte der Basilararterie.

### Zusammenfassung.

Resumierend finden wir unter 98 gleichzeitig nach Wassermann und Porges untersuchten Leichenseren bei 8 Fällen Uebereinstimmung, bei 4 Fällen positive Wassermannsche, negative Porgessche Reaktion, während 21 Fälle bei negativem Wassermann Ausflockung gaben. A priori könnte es scheinen, daß die Porgessche Reaktion eine feinere diagnostische Methode sei, da sie in einer weit größeren Zahl von Fällen Ausschläge gibt, als die Wassermannsche Reaktion. Dem scheint jedoch nicht so zu sein: denn, wie aus den in der zweiten Gruppe mitgeteilten Fällen hervorgeht, trat sie auch dort auf, wo weder die Anamnese noch die klinische Untersuchung noch der anatomische Befund auch nur den Verdacht auf

Lues ergeben hatte, andererseits fehlte sie gerade in zwei Fällen, bei denen die Wassermannsche Reaktion positiv war und auch der anatomische Befund die Annahme einer Lues als sehr wahrscheinlich hinstellte.

Aus diesen Gründen kommt der Porgesschen Ausflockungsreaktion — zumindest für die pathologische Anatomie — kein diagnostischer Wert zu. Inwieferne sie zur Diagnose bei von Kranken (Lebenden) stammenden Seren herangezogen werden kann, wollen wir mit Rücksicht auf die relativ geringe Zahl der von uns untersuchten Fälle kein abschließendes Urteil fällen.

#### Literatur.

- Marie und Levaditi, Annales de l'Institut Pasteur, T. 21, 1907.  
 Landsteiner, Müller und Pötzl, Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 17.  
 Porges, O., Berliner klin. Wochenschr., 1907, No. 51.  
 — Wiener klin. Wochenschr., 1908, p. 176.  
 — Sitzungsberichte der k. k. Gesellschaft der Aerzte. Wiener klin. Wochenschr., 1908, p. 743.  
 — Handbuch von Kraus und Levaditi.  
 Porges und Meier, Sitzungsberichte. Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 6.  
 Elias, Neubauer, Porges und Salomon, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 23.  
 Fritz und Kren, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 12.  
 Bauer und Meier, Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 51.  
 Russ, Militärarzt 1909, No. 10. Beil. d. Wiener med. Wochenschr., 1909, No. 21.  
 Schwarzwald, Wiener klin. Wochenschr., 1909, No. 28.  
 Löhlein, Fortschritte der Medizin, 1909, No. 3.  
 Fränkel und Much, Münchner med. Wochenschr., 1908, No. 48.  
 Pick und Proskauer, Med. Klinik, 1908, No. 15.  
 Seligmann und Blume, Berliner klin. Wochenschr., 1909, No. 24.  
 Stumme, Sitzungsberichte d. Gesellsch. d. Aerzte, 1908.  
 Weil und Braun, Wiener klin. Wochenschr., 1908.  
 Schenk, Münchner med. Wochenschr., 1909, No. 28.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie an der Universität  
Straßburg; Direktor: Professor Dr. Forster.]

**Ueber die Verwendbarkeit der Präzipitinreaktion zur  
Rotzdiagnose und die Beziehungen der Rotzpräzipitine  
zu den Rotzagglutininen.**

Von Kreistierarzt Dr. M. Müller.

Mit 1 Figur im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. Juli 1909.)

Die Unstimmigkeiten über den Wert des Malleïns zur Sicherung der Rotzdiagnose haben das Suchen nach weiteren Methoden zur Erkennung der Rotzkrankheit zur Folge gehabt. Diesem Bestreben, die Diagnose des chronischen okkult verlaufenden Rotzes sicherer und einwandsfreier zu gestalten, als es mit Hilfe des Malleïns möglich ist, mußten insbesondere die Ergebnisse der serologischen Forschungen zu gute kommen.

Es soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden, ob das Malleïn ein brauchbares oder unbrauchbares Rotzdiagnostikum ist; eines müssen aber auch jetzt schon die Malleïngegner zugeben: auch den serologischen Methoden kommt eine absolute Sicherheit hinsichtlich der intravitalen Erkennung okkult verlaufender Rotzfälle — wie dies seitens der Malleïngegner vom Malleïn verlangt wird — nicht zu. So wenig sich die Malleïnreaktion in stereotype Formeln einzwängen läßt, so wenig geben auch die serologischen Befunde in allen Fällen eine absolute Gewißheit über das Vorliegen oder die Abwesenheit von Rotz in Verdachtsfällen. Hier wie dort zeigt sich, daß für die Stellung der positiven oder negativen Diagnose ein gewisser „Grad“ der Reaktion ausschlaggebend bleibt. Zur Vermeidung von Fehldiagnosen bei der Ermittlung rotziger Tiere bedarf es daher vor allem der Erfahrung zur richtigen Beurteilung jenes Grades der Reaktionen, welcher für einen positiven Befund spricht.

Im Interesse der veterinärpolizeilichen Bekämpfung der Rotzkrankheit ist aber nicht nur ein sicheres, sondern auch

ein schnell arbeitendes diagnostisches Verfahren erwünscht. Ein diesen Forderungen entsprechendes diagnostisches Verfahren erschien uns neben der Beschleunigung der Agglutination durch Zentrifugieren in der Präzipitinreaktion gegeben. Auf Grund von Laboratoriumsversuchen konnten wir im August 1908 auf die Verwendbarkeit der Präzipitinreaktion zur schnellen Sicherung der Rotzdiagnose bereits hinweisen. Wir hatten die Absicht, die eingehende Bekanntgabe unserer Befunde erst dann erfolgen zu lassen, nachdem dieselben auch bei rotzkranken Pferden experimentell und praktisch ihre Bestätigung gefunden hatten. Die Ausführung dieser Absicht konnte jedoch infolge der nicht gegebenen Möglichkeit zur Einstellung rotziger Versuchspferde als auch des gänzlichen Mangels von Rotzfällen in Elsaß-Lothringen seit Beginn des Jahres 1907 bislang nicht erfolgen.

Inzwischen konnte Pfeiler — bei dem ihm zu Gebote stehenden reichlichen Materiale an rotzverdächtigen Blutproben von Pferden — der Frage über die praktische Verwertbarkeit der Präzipitinreaktion zur Sicherung der Rotzdiagnose im Pathologischen Institut der tierärztlichen Hochschule in Berlin nähertreten und über die Verwendbarkeit der Reaktion bei der veterinärpolizeilichen Bekämpfung der Rotzkrankheit in Preußen berichten <sup>1)</sup>.

Bei dieser Sachlage erscheint uns eine nähere Mitteilung über unsere Technik und Befunde gleichfalls angezeigt.

Die ersten Untersuchungen über Rotzpräzipitine hat Deduillin angestellt, dessen Befunde von Wladimiroff weiter ergänzt wurden. Sie fanden bei Verwendung filtrierter Rotzkulturen im Blute gesunder Pferde geringe, bei rotzkranken Pferden reichliche Mengen nachweisbaren Präzipitins. Mit den Filtraten verschiedener Rotzkulturen wurden jedoch ungleiche Resultate erhalten, so daß keine diagnostisch verwertbaren Normen aufgestellt werden konnten. Wladimiroff glaubte vielmehr die praktische Verwertung der Rotzpräzipitine von der Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung der Präzipitatenmenge abhängig machen zu müssen.

Bonome suchte die Schwankungen des Präzipitingehaltes im Blute rotzkranker Tiere klarzulegen. Hierbei machte er gleichfalls auf den Befund von Normalpräzipitinen im Blute gesunder Pferde aufmerksam.

---

1) Anmerkung bei der Korrektur: In einer kürzlich erfolgten Mitteilung bestätigt auch Mießner die von uns bereits gemachte Angabe, daß die Präzipitinreaktion zur Sicherung der Rotzdiagnose verwertet werden kann.

Seine Untersuchungen ergaben jedoch meist keine wesentlichen graduellen Unterschiede zwischen dem Präzipitingehalt des Blutes rotzkranker und gesunder Tiere. Eine diagnostische Verwertung seiner Befunde konnte bei seiner Versuchsanordnung nicht erfolgen. In den Filtraten von Rotzbouillonkulturen fand er keine oder nur Spuren präzipitogener Substanzen.

Pfeiler konnte seit Oktober 1908 452 Blutproben von 306 rotzverdächtigen oder der Ansteckung verdächtigen Pferden auf das Vorhandensein von Rotzpräzipitinen prüfen, von denen 30 auf Grund des Präzipitinnachweises als rotzkrank anzusehen waren. Die Präzipitinreaktion hat sich nach Pfeiler sowohl zur Ermittlung frischer als auch älterer Fälle bewährt, in 2 Fällen allerdings versagt. Als Präzipitinogen verwandte er ein Karbolkoehsalz-Schüttelextrakt von Rotzbacillen.

Bei unseren Versuchen bedienten wir uns ständig der zuerst von Ascoli für die Präzipitation empfohlenen und durch Fornet im hiesigen Institut weiter ausgearbeiteten Schichtprobe, deren Verwendung wir auch für den biologischen Nachweis tierischer Eiweißarten empfohlen haben.

Der Ansicht Fukuharas, daß die Schichtprobe nicht brauchbar für den Präzipitinnachweis sei, vermögen wir uns nicht anzuschließen. Allerdings ist die Schichtprobe wesentlich empfindlicher als die Mischprobe und sie indiziert daher noch Reaktionen, die bei der Mischung nicht mehr wahrgenommen werden. Insbesondere wird die Schichtung das Vorhandensein von Normalpräzipitinen, wie dies ja auch Ascoli bereits erwähnt, leichter kenntlich machen als die Mischprobe, die aber nach den Angaben von Kraus gleichfalls derartige Trübungen nichtspezifischer Natur auftreten läßt. Das Serum rotzfreier Pferde und Meerschweinchen zeigt bei der Kontaktwirkung mit Rotzpräzipitinogen sowohl bei der Schichtung eine schwache bis starke Ringbildung als auch bei der Mischung schwache bis starke Trübungen. Beim Schichten oder Mischen des gleichen Rotzpräzipitinogens auf normales Kaninchenserum tritt dagegen häufig keinerlei Reaktion auf. Wir sehen also, daß das Auftreten der nichtspezifischen Trübung im Serum rotzfreier Pferde nicht auf Kosten der Schichtung zu setzen ist, sondern daß wir es hier mit einem normalen Vorgange bei beiden Methoden zu tun haben, der allerdings bei der diagnostischen Verwertung der Präzipitinreaktion eine gewisse Erfahrung in der Beurteilung dieser Trübungen voraussetzt. Abgesehen hiervon, wird die Schichtprobe im hiesigen Institut der Mischprobe für den Nachweis von Präzipitinen insbesondere deshalb vorgezogen, weil die feinen Reaktionen der Schichtprobe gegenüber jenen der Mischprobe leichter objektiv wahrnehmbar sind. Bei der Schichtprobe tritt infolge der flächenförmigen Kontaktwirkung der beiden Flüssigkeiten auch die Reaktion flächen- bzw. ringförmig als Scheibe inmitten einer klaren Flüssigkeitssäule auf. Die Schichtprobe zeigt ferner eigentümliche Phänomene in Gestalt von Doppelringen, welche bei der Mischung verloren gehen (siehe Fig. 1). Ähnliche Doppelringe, auf die



ich mit Fornet bei unseren Untersuchungen über Eiweißpräzipitine schon hingewiesen habe, treten auch bei der Bildung der Rotzpräzipitine in Erscheinung und können hier allem Anscheine nach hinsichtlich des Alters der Rotzinfektion diagnostisch verwertet werden.

Schließlich erscheint es nicht überflüssig, darauf hinzuweisen, daß als Reaktion bei der Schichtprobe nur jene ringförmigen Trübungen angesehen werden dürfen, die aus einem „deckfarbenen“ weißgrauen Präzipitat in Scheibenform bestehen, während die durchsichtigen „lackfarbenen“, sich langsam abtönenden Ringe, die häufig beim Zusammentreffen heterologer Flüssigkeiten von verschiedener Färbung und Konzentration zu beobachten sind, als Reaktionen nicht angesprochen werden dürfen.

Zur leichten Bewerkstelligung der Schichtung verwenden wir kleine Gläschen von 0,5 cm Weitedurchmesser, in die zunächst ca. 6 Tropfen des spezifisch schwereren präzipitin-haltigen Serums gefüllt werden, worauf dann vorsichtig die gleiche Menge des präzipitinogenhaltigen Bacillenextraktes hinzugefügt wird. Die Füllung der Gläschen geschieht zweckmäßigerweise mit einer Kapillarpipette, welche oben mit einem kleinen Gummiballon versehen ist. Bei gelungener Schichtung zeigt die Flüssigkeitssäule in der Mitte eine starke Lichtbrechung. Zur leichten Erkennung des Anfangsstadiums der an dieser Stelle einsetzenden scheibenförmigen Reaktion ist das Licht durch einen dunklen Gegenstand abzublenden.

Als Präzipitinogen bedienen wir uns stets des Filtrates einer Rotzbouillonemulsion, die durch mehrtägiges Stehenlassen mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmter Glycerinagarkulturen gewonnen worden waren.

Das Rotzpräzipitin suchten wir zunächst bei rotzig infizierten Meerschweinchen nachzuweisen, gleichzeitig wurde hierbei geprüft, inwieweit das Auftreten der Präzipitine mit den Agglutininen beim Rotz Uebereinstimmungen zeigt. Die Meerschweinchen erweisen sich für diese Versuche jedoch insofern nicht besonders geeignet, als jedes Tier in der Regel nur eine einmalige Blutentnahme gestattete und auch das Normalserum sowohl jüngerer als auch älterer Meerschweinchen stets einen schwächeren oder stärkeren Gehalt von Normalpräzipitinen aufwies. Die Einzelheiten der Versuchsanordnung

sind aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich. Das erste nach 24 Stunden zu verblutende Tier erhielt, um die Möglichkeit des Präzipitinnachweises zu erhöhen, die doppelte Bacillmenge wie die Tiere 2—9, während bei den Tieren 10—12 die Impfmenge herabgesetzt wurde, um ein zu frühes Eingehen der Tiere zu verhindern.

Tabelle I.

Laufende No.	Intraperitoneal verimpfte Menge Rotzkultur (Oese = 1,2 mg)	Verblutung post infectionem erfolgte nach	Präzipitinreaktion			Korrespondierender Agglutinations-titer
			1. Ringbildung	2. Präzipitatzbildung nach 24 Stunden	Aufhellungs- u. Trübungsbefunde nach 24 Stunden	
1	$\frac{1}{100}$ Oese	24 Stunden	Nach 10 Min. scharf. Ring Nach 20 Min. scharf. Doppelring Nach 30 Min. Zunahme der Stärke des oberen Ringes und Abflauen der Stärke des unteren Ringes	0	Aufhellung	unter 1:100
2	$\frac{1}{200}$ "	2 Tagen	Nach 10 Min. einfacher Ring Nach 20 Min. Doppelring, welcher ca. 1 Stunde bestehen bleibt	0	Nach 24 Stdn. n. schwache Trübung an der Schichtgrenze; nach 48 Stdn. völlige Aufhellung	unter 1:100
3	$\frac{1}{200}$ "	3 "	Nach 10 Min. deutlicher Ring Nach 60 Min. Andeutung eines Doppelringes, der nach 2 Stunden wieder verschwunden	scharfrandig-punktförmig	Aufhellung	unter 1:100
4	$\frac{1}{200}$ "	4 "	Nach 5 Min. deutlicher Ring	wie 3	Aufhellung	1:200 (schwach)
5	$\frac{1}{200}$ "	5 "	dgl. nach 5 Min.	0	schwach. Trübung noch vorhanden	1:400
6	$\frac{1}{200}$ "	6 "	" " 5 "	feinschleierartig	starke Aufhellung	1:600
7	$\frac{1}{200}$ "	7 "	" " 1 "	dgl.	dgl.	1:1000
8	$\frac{1}{200}$ "	8 "	Ring momentan	deutlich schleierartig	"	1:1000
9	$\frac{1}{200}$ "	10 "	" "	dgl.	"	1:3000
10	$\frac{1}{400}$ "	12 "	" "	"	"	1:4000
11	$\frac{1}{400}$ "	14 "	" "	"	"	1:3000
12	$\frac{1}{400}$ "	—	(am 15. Tage nach der Infektion an Rotz eingegangen)			—

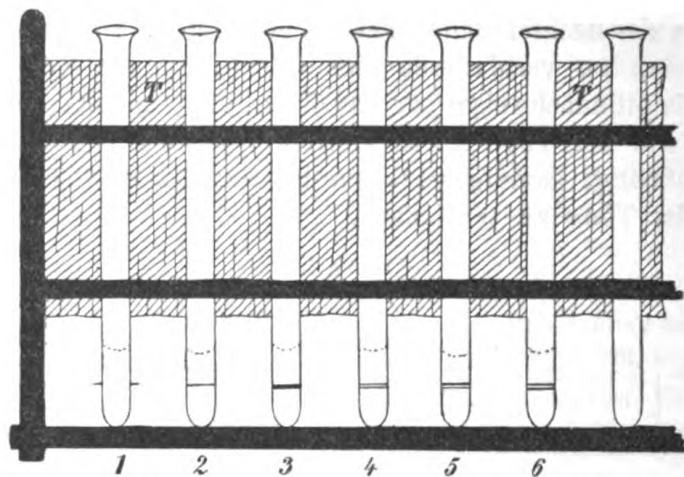


Fig. 1. 1 Schichtungsgrenze bei **-U-** ( ) = obere Flüssigkeitsgrenze. 2 Beginnende Reaktion bei starkem Präzipitingehalt. 3 Ringbildung bei positiver Reaktion auf der Höhe, vor beginnender Ausflockung. 4 Doppelring nach 20 Minuten in Serum 1, Tabelle I. 5 Doppelring nach 30 Minuten in Serum 1, Tabelle I. 6 Doppelring nach 20 Minuten in Serum 2, Tabelle I. T = schwarzer Tuchstreifen.

Mit Rücksicht auf den Gehalt an Normalpräzipitinen des Meerschweinchenblutes, wurden den Tieren 1, 2 und 3 vor der Infizierung Blutproben der Ohrmuschel entnommen und das Serum dieser Proben mit dem gleichen später zu verwendenden Filtrat geprüft. Hierbei ergab Meerschweinchen 1 nach 15 Minuten, 2 und 3 nach 5 Minuten langer Kontaktwirkung eine schwache, aber deutliche Ringbildung infolge der Anwesenheit von Normalpräzipitinen. Nach Ablauf von 24 Stunden konnten an der Schichtgrenze noch Trübungen wahrgenommen werden.

Der Befund dieser Normalpräzipitine erschwert die einwandsfreie Deutung der in der Tabelle niedergelegten Befunde. Bei der Beurteilung jenes Zeitpunktes, der zuerst den Präzipitingehalt im Meerschweinchen Serum erkennen läßt, kann daher das subjektive Empfinden nicht ganz unberücksichtigt bleiben. Die objektive Deutung des Eintrittes dieses Zeitpunktes würde nach der Tabelle für den 4. Tag sprechen. Das stünde in Uebereinstimmung mit der Beobachtung Pfeilers über das Auftreten der Rotzpräzipitine bei Versuchspferden gleichfalls am 4. Tag. Auch die Eiweißpräzipitine lassen sich nach unseren Erfahrungen bereits zu dieser Zeit ohne Schwierigkeit nachweisen. Das gleichzeitige

Ansteigen des Agglutinationstiters am 4. Tage würde fernerhin zugunsten der von Paltauf, Kraus, v. Pirquet und Wassermann vertretenen Ansicht der Identität von Präzipitin und Agglutinin sprechen. Berücksichtigt man indessen die Befunde bei dem Serum der Tiere 1, 2 und 3 im Vergleich zu den Befunden bei dem gleichen Serum vor der Infektion, so dürfte die Deutung der hier zu beobachtenden Vorgänge ebenfalls mit der einsetzenden Bildung von Präzipitinen zu vollziehen sein.

Die Bildung von Doppelringen (siehe Fig. 1) wurde vor der Infektion nicht beobachtet. Nach unseren Erfahrungen über das Vorkommen der Doppelringe bei der Eiweißpräzipitation tritt das erwähnte Phänomen während des Bildungsstadiums der Präzipitine in Erscheinung. Wir halten daher den Analogieschluß für berechtigt, daß auch in einem rotzpräzipitinhaltigen Serum das konstante Auftreten des Doppelringphänomens als Indikator für eine bereits erfolgende Präzipitinbildung angesehen werden kann. Die Richtigkeit dieser Ansicht vorausgesetzt — dieselbe soll an anderer Stelle noch eingehender dargelegt werden — kann dann der eventuelle Befund von Doppelringen im Pferdeserum rotzverdächtiger Pferde dahin gedeutet werden, daß das betreffende Tier noch im Anfangsstadium der Infektion begriffen ist.

(Der Doppelring kann nur dann als spezifisch angesehen werden, wenn derselbe bei exakter Ueberschichtung eines Serums ständig in Erscheinung tritt und zwischen den beiden Ringen eine völlig klare, ganz schmale Flüssigkeitsschicht von ca.  $\frac{1}{2}$ —1 mm Breite sich befindet.)

Auch das verschiedenzeitige Auftreten der Präzipitine nach der Infektion von den Normalpräzipitinen der gleichen Sera in Verbindung mit der innerhalb 24—48 Stunden erfolgenden Aufhellung spricht für eine Verschiedenartigkeit der Präzipitine post infectionem von den Normalpräzipitinen ante infectionem. Eine Präzipitatbildung, wie sie von Kraus bei der einwandsfreien Präzipitation, insbesondere in Form des schleierartigen Belages verlangt wird, ließ sich bei den schwachen Reaktionen nicht vor dem 6. Tage der Präzipitinbildung wahrnehmen.

Da sich bei der Prüfung auf Normalpräzipitine herausstellte, daß das Kaninchenserum im Gegensatz zum Serum von Meerschweinchen entweder gar keine oder nur Spuren von Normalpräzipitinen enthielt, schien uns das Kaninchen besser zu weiteren Studien über das Auftreten von Rotzpräzipitinen geeignet. Bei einem mittelgroßen Kaninchen konnte eine häufigere Blutentnahme erfolgen und hiermit war dann auch die Möglichkeit gegeben, die fortschreitende Bildung von Präzipitinen und Agglutininen bei einem und demselben Tiere beobachten zu können. Allerdings mußte bei Verwendung von Kaninchen auch mit der weniger großen Empfänglichkeit dieser Tiere gegen Rotzinfektion gerechnet werden. Bei der Prüfung des Kaninchensersums auf Rotzpräzipitine und Agglutinine mußte ein derartiger Versuch aber auch intra vitam die Frage entscheiden lassen, ob eine Rotzinfektion erfolgt ist oder nicht.

Zu dem Versuch wurde ein mittelschweres Kaninchen mit  $\frac{1}{200}$  Oese einer Glyzerinagarrotzkultur intraperitoneal geimpft, nachdem die Vorprüfung des Serums auf Normalpräzipitine ein völlig negatives Resultat ergeben hatte.

Tabelle II.

Lfde. No.	Kaninchen intraperitoneal geimpft mit $\frac{1}{200}$ Oese Rotzagar-kultur Blutentnahme aus der Ohrvene erfolgte	Präzipitinreaktion			Korrespondier. Agglutinations-titer
		1. Ringbildung	2. Präzipitat-bildung nach 24 Std.	3. Aufhellungs- u. Trübungsbefunde nach 24 Std.	
1	vor der Infekt.	0	0	—	unter 1:100
2	3 Tage nach der Infektion	0	0	—	1:200
3	5 dgl.	0	0	—	1:600
4	7 „	schwach. Ring nach 30 Min.	0	Trübung an der Schichtgrenze noch vorhanden	1:800
5	10 „	dgl. n. 20 „	fein schleierartig	Aufhellung	1:800
6	12 „	„ „ 30 „	0	wie 4	1:800
7	17 „	„ „ 40 „	0	wie 4	1:1000
8	26 „	Ring nach 1 Min.	deutlich schleierartig	Aufhellung	1:3000
9	34 „	Ring moment.	dgl.	„	1:6000
10	40 „	„ „	„	„	1:7000
11	50 „	„ „	„	„	1:7000

Nach dem vorstehenden Versuch ist also beim rotzig infizierten Kaninchen innerhalb der ersten 5 Tage kein Präzipitin nachweisbar, vom 10.—17. Tag ist dasselbe in sehr spärlicher Menge vorhanden und tritt erst zwischen dem 17. und 26. Tage nach der Infektion deutlich in Erscheinung. Demgegenüber verhält sich der Agglutinationstiter der gleichen Sera durchaus verschieden. Der unter 1:100 liegende Titer des Normalserums steigt bis zu dem Zeitpunkte, an welchem die Präzipitinreaktion eben bemerkbar wird, auf 1:800, hält sich dann allerdings, solange die Präzipitinreaktion sehr schwach ist, auf annähernd gleicher Höhe und hat bei dem einwandsfreien Nachweis der Präzipitine den hohen Titer von 1:3000 schon erreicht. Eine Zunahme in der Stärke der Präzipitinreaktion ist vom 34. Tage ab nicht mehr nachweisbar; der Agglutinationstiter erfährt noch eine geringe Steigerung.

Der Vergleich dieses Versuches beim Kaninchen mit jenem beim Meerschweinchen zeigt weiterhin den interessanten Befund, daß beim Meerschweinchen zunächst der Präzipitingehalt des Blutes nachweisbar ansteigt und der Agglutinationstiter erst dann in die Höhe geht, nachdem der Nachweis der Präzipitine als einwandfrei angesehen werden kann. Beim Kaninchen liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt. Hier erfolgt ein schnelles Ansteigen des Agglutiningehaltes des Blutes ohne gleichzeitig nachweisbaren Präzipitingehalt des Serums. Die Präzipitine treten hier erst dann einwandfrei in Erscheinung, nachdem der Agglutinationstiter bereits auf 1:3000 gestiegen ist.

Wennschon häufig eine weitgehende Korrelation zwischen dem Auftreten von Agglutininen und Präzipitinen besteht, so sprechen die hier beobachteten Differenzen doch wohl gegen die völlige Identität der beiden Immunkörper. Die Befunde bestätigen somit die Annahme von Radziewsky, Bail, E. Pick und Gaethgens, daß Präzipitine und Agglutinine als verschiedene Antikörper anzusehen sind. Auch nach den Befunden Pfeilers sind bei rotzkranken Pferden die Präzipitine häufig vor den Agglutininen nachweisbar. Gerade die praktische Verwertung des

Präzipitin- und Agglutiningehaltes des Blutes bei der Stellung der Rotzdiagnose dürfte bei vergleichender Untersuchung dazu angetan sein, diese Streitfrage weiter zu klären.

Die Ergebnisse der vorstehenden Untersuchungen und zahlreicher Vorversuche berechtigten mit Gewißheit zu der von uns schon früher zum Ausdruck gebrachten Schlußfolgerung, daß die Präzipitinreaktion auch praktisch für die Rotzdiagnose verwertbar sei. Gerade die Einfachheit und der schnelle Ablauf der Reaktion lassen die Präzipitinreaktion besonders geeignet für die Rotzdiagnose erscheinen. Der Gehalt des Blutes rotzfreier Tiere an Normalpräzipitinen kann hierbei nicht schwerwiegend ins Gewicht fallen. Nach den Befunden von Kraus, Ascoli, Bail und Weil, Fornet, Hoke, Plaut und Rossi, Fukuhara u. a. werden nicht spezifische Trübungen und Niederschläge häufig beobachtet. Die Präzipitation ist daher im allgemeinen bei praktischer Verwertung nur dann diagnostisch zu verwerten, wenn dieselbe in der von Kraus geforderten typischen Weise — Ringbildung bzw. Trübung mit folgender Präzipitatbildung und Aufhellung verläuft und geeignete Kontrollen (Normalserum + Filtrat, Normalserum + physiologische NaCl-Lösung und Rotzserum + physiologische NaCl-Lösung) keine oder nur schwache Trübungen ohne Präzipitatbildung und Aufhellung nach 24 Stunden ergeben.

Um einen Einblick in das verschiedenartige Verhalten der Normalpräzipitine von den spezifischen Präzipitinen zu erhalten, habe ich eine Reihe Sera rotzfreier Pferde, Meerschweinchen und Kaninchen geprüft und die Befunde in der folgenden Tabelle wiedergegeben (s. Tabelle III auf p. 411).

Es zeigt sich also, daß sämtliche geprüfte Pferdesera einen schwächeren und stärkeren Gehalt an Normalpräzipitinen aufweisen. Eine auffallende Übereinstimmung des Grades bei den Normalpräzipitinen und Normalagglutininen kann in Tabelle III (insbesondere bei den Meerschweinchen) nicht beobachtet werden. Die Normalpräzipitine unterscheiden sich aber bei der Schichtung von den spezifischen Rotzpräzipitinen in der Regel durch den Mangel eines erkennbaren Präzipitates. Die Menge desselben war in den beobachteten Fällen sehr gering. In allen Fällen zeigt sich aber weiterhin, daß eine völlige oder

Tabelle III.

Lfde. No.	Rotzbacillen- filtrat in Schichtungs- kontakt mit Normalserum von	Reaktion in Form von			Aggluti- nations- titer des Serums
		1. Ringbildung oder Trübung an der Schichtgrenze	2. Präzipitat- bildung nach 24 Std.	3. starke oder völlige Auf- hellung nach 24 Std.	
1	Schlachtpf. 1	schwache Trübung nach 30 Min.	0	erfolgt nicht	1:400
2	" 2	dgl. nach 5 "	0	" "	1:800
3	" 3	" " 15 "	punktförmig	" "	—
4	" 4	" " 10 "	0	" "	—
5	" 5	" " 30 "	0	" "	1:200
6	" 6	deutlicher Ring nach 30 Min.	0	" "	1:400
7	" 7	schwache Trübung nach 15 Min.	punktförmig	" "	1:200
8	" 8	dgl. nach 5 "	"	" "	—
9	" 9	" " 2 "	"	" "	1:400
10	" 10	" " 10 "	0	" "	1:400
11	" 11	" " 10 "	0	" "	1:200
12	" 12	deutlicher Ring nach 10 Min.	punktförmig	" "	1:300
13	" 13	schwache Trübung nach 5 Min.	0	" "	1:400
14	" 14	dgl. nach 10 "	punktförmig	wahrnehmbar nicht völlig erfolgt nicht	1:200
15	" 15	" " 10 "	0	" "	1:800
16	" 16	" " 15 "	fein schleierartig	" "	1:600
17	" 17	" " 5 "	0	" "	1:600
18	" 18	deutlicher Ring nach 30 Min.	fein schleierartig	wahrnehmbar nicht völlig erfolgt nicht	1:400
19	" 19	dgl. nach 30 "	0	" "	1:1000
20	" 20	schwache Trübung nach 5 Min.	fein schleierartig	" "	1:400
21	" 21	dgl. nach 10 "	punktförmig	" "	1:300
22	" 22	" " 15 "	0	" "	1:200
23	" 23	" " 15 "	0	" "	1:500
24	" 24	" " 15 "	0	" "	1:200
25	Meersch. 1	deutlicher Ring nach 15 Min.	0	" "	unter 1:100
26	" 2	dgl. nach 5 "	fein schleierartig	" "	dgl.
27	" 3	" " 5 "	dgl.	" "	"
28	" 4	" " 10 "	0	" "	"
29	" 5	" " 10 "	fein schleierartig	" "	"
30	" 6	" " 10 "	dgl.	" "	"
31	Kaninchen 1	" " 0 "	0	völlig klar	"
32	" 2	" " 0 "	0	" "	"
33	" 3	schwache Trübung nach 15 Min.	0	" "	"



starke Aufhellung an der Schichtgrenze nach 24-stündiger Aufbewahrung (hiervon 22 Stunden im Eisschrank) nicht erfolgte. Bei den Sera rotziger Versuchstiere wurde in der Regel, sofern eine starke Präzipitatbildung erfolgte, völlige oder starke Aufhellung beobachtet; war die Reaktion sehr schwach, so wurde allerdings häufig auch das Persistieren der Trübung an der Schichtgrenze ohne Präzipitatbildung über 24 Stunden hinaus beobachtet.

Aus den Befunden No. 4, 5, 6, 7 der Tabelle II ergibt sich aber andererseits, daß auch aus schwachen Trübungen allein, also auch bei mangelnder Präzipitatbildung und Aufhellung die Reaktion als positiv erklärt werden kann, denn hier ergeben die vorhergehenden und folgenden Befunde, daß diese schwachen Trübungen nur aus echten Rotzpräzipitinen bestehen können. Bei der Mischprobe konnten diese leichten Trübungen nicht mehr einwandfrei wahrgenommen werden.

Fukuhara glaubt sich auf Grund seiner Versuche zu der Behauptung berechtigt, daß die Ringprobe allein, wenn nicht auch Mischproben gemacht werden, gar keinen Schluß auf spezifische Präzipitine oder Präzipitinogene erlaubt. Ohne die Richtigkeit der Fukuharaschen Befunde anzweifeln zu wollen, vermisste ich jedoch in seinen Tabellen I—VII neben dem Befund bei der Ringbildung jeglichen Befund über die gleichzeitig angestellte Mischprobe. Die Fukuharaschen Befunde könnten als beweisend angenommen werden, wenn in den positiven Fällen der Ringprobe — soweit dieselben nicht als spezifisch anzusehen sind — die gleichzeitig angestellten Mischproben nie Trübungen ergeben hätten. Bei Erscheinen der Fukuharaschen Befunde waren die vorliegenden Untersuchungen in der Hauptsache abgeschlossen. Da Herr Gaethgens infolge einer im Mai sich zugezogenen schweren Typhusinfektion vorerst nicht in der Lage ist, den Fukuharaschen Ausführungen selbst zu entgegenen, habe ich in einigen Fällen die Resultate der Schicht- und Mischprobe verglichen. Die folgende Tabelle dürfte eine Uebertragung der Fukuharaschen Ansicht über die Nichtspezifität der Schichtprobe und die aus-

schließliche Spezifität der Mischprobe für die vorliegenden Untersuchungen nicht gestatten.

Tabelle IV.

Laufende No.	1 ccm Rotzbacillenfiltrat + 0,2 ccm Serum von	Reaktion erfolgt in Form von		
		Trübung	Präzipitatbildung	Aufhellung
1	Schlachtpferd 18 <sup>1)</sup>	schwach nach 15 Minuten	feiner Schleier nach 48 Stdn.	erfolgt nicht
2	" 19	dgl. nach 10 Min.	dgl. nach 24 Stdn.	" "
3	" 22	" " 15 "	" " 48 "	" "
4	" 23	" " 15 "	" " 48 "	" "
5	" 24	" " 15 "	" " 48 "	" "
6	Meerschweinchen 3	stark nach 2 Min.	0 nach 24 Stdn.	erfolgt nach 48 Stdn. mit Trübung an der Oberfläche
7	" 5	" " 5 "	0 " 24 "	erfolgt nach 48 Stdn.
8	" 6	" " 5 "	0 " 24 "	" " 48 "
9	Kaninchen 2	0	0	bleibt klar
10	" 3	0	0	" "
11	Rotzmeerschweinchen	sofort	Schleier nach 24 Stdn.	Aufhell. nach 24 Stdn.
12	Rotzkaninchen	"	dgl. nach 24 Stdn.	" " 24 "
13	Rotzimmunserum-Kaninchen	"	" " 24 "	" " 24 "
14	0,2 ccm Serum + 1 ccm phys. NaCl-Lösung	0	0	bleibt klar

Es zeigt sich also, daß nicht nur die Ring-, sondern auch die Schichtprobe nicht spezifische Trübungen geben kann und daß dieselben in beiden gleich gut wahrnehmbar sind. Schwache Trübungen bleiben bei der Schichtung leichter objektiv wahrnehmbar, während bei der Mischung subjektives Empfinden die ersten Trübungsgrade leicht verkennen kann. Der Aufhellungsbefund bei spezifischen Präzipitationen ist nach 24 Stunden bei der Mischprobe in der Regel kompletter als bei der Schichtprobe.

Den Befunden der Fukuharaschen Ringproben kann somit infolge des Mangels vergleichender Mischproben **keine** Beweiskraft zugesprochen werden gegen die Schlußfolgerungen, welche Gaethgens aus der Ringprobe gezogen hat.

1) Die Zahlen beziehen sich auf Tabelle III.

Pfeiler sucht bei der Präzipitinreaktion das Auftreten von Normalpräzipitinen durch Verdünnen des Bacillenfiltrates mit der 6—12-fachen Menge Normalpferdeserum und abermaliges Verdünnen dieser Mischung mit Kochsalzlösung zu umgehen. Hierdurch wird das Präzipitinogen schwach trüb und soll erst nach 1 Stunde Normalringe auftreten lassen. Da die Normalpräzipitine des Pferdeserums bei einiger Uebung unschwer als solche zu erkennen sind, scheinen mir dieselben auch für die praktische Rotzdiagnose weniger von Belang, als dies Pfeiler annimmt. Versuche, die Normalpräzipitine durch Verdünnen des Präzipitinogens abzutönen, habe ich als zwecklos gefunden, weil auch in starken Verdünnungen die Normalpräzipitine, wenn auch langsam, erscheinen. Einen ähnlichen Befund ergibt übrigens auch das Pfeilersche Filtratserum nach Ablauf einer Stunde. Sind aber im Pferdeserum Rotzpräzipitine reichlich vorhanden, so werden dieselben bei Verwendung hochwertiger klarer präzipitinogenhaltiger Filtrate so schnell und stark in Erscheinung treten, daß ein Zweifel über den Befund nicht entstehen kann. Bei schwachem Präzipitinhalt wird die schwache Trübung und die starke Verdünnung des nach den Pfeilerschen Angaben bereiteten Filtrates erschwerend auf die richtige Beurteilung wirken, zumal infolge der Trübung des Filtrates der weitere Ablauf der spezifischen Reaktion (Präzipitatbildung und Aufhellung nach 24 Stunden) schwer beurteilbar sein werden.

Zur praktischen Verwertung der Reaktion bot sich uns im Jahre 1908 dreimal in Verdachtsfällen Gelegenheit. Die drei Blutproben zeigten nur schwache, durch Normalpräzipitine bedingte nichtspezifische Reaktionen, deren Beurteilung im negativen Sinne keinerlei Schwierigkeiten bot.

Bei der Beurteilung der Reaktionen verfahren wir in der Weise, daß die überschichteten Röhrchen zunächst 5 Minuten bei Zimmertemperatur beobachtet werden. Die Reaktion tritt bei stark rotzpräzipitinhaltigem Serum momentan oder nach Ablauf weniger Minuten deutlich in Erscheinung und kann hiermit bereits als „positiv“ angesprochen werden. Ist keine oder nur schwache Reaktion bemerkbar, so kommen die Eproutetten 10—30 Minuten bei 37°, bleiben hierauf bei nicht ein-

wandsfreiem Ergebnis noch ca. 1 Stunde bei Zimmertemperatur zur weiteren Beobachtung und werden dann bis am nächsten Tage im Eisschrank aufbewahrt, worauf unter kritischer Würdigung der gegebenen Befunde die definitive Beurteilung erfolgt.

Hinsichtlich der Bezeichnung dürfte das Verfahren als auf dem Präzipitinnachweis beruhend folgerichtig als Präzipitinreaktion zu bezeichnen sein.

Die Präzipitinogenreaktion nach Fornet haben wir bei einer Reihe von Sera frisch rotziger Tiere versucht. Da hierbei die praktische Verwertbarkeit der Präzipitinogenreaktion für das Inkubationsstadium geprüft werden sollte, also für jene Zeit, in der die Rotzpräzipitine nicht oder nur sehr schwach nachweisbar sind, wurden Sera von 1—6 Tagen alt infizierten Tieren mit hochwertigem Rotzimmunserum zweier Kaninchen (Agglutinationstiter 1:100 000 und 1:200 000) als auch rotzpräzipitinhaltigem Serum mehrerer Meerschweinchen in verschiedenen Verdünnungskombinationen in Kontakt gebracht. Die Versuche ergaben indessen kein praktisch verwertbares Resultat. Unmittelbar nach der Infektion und vor Ablauf einer 24-stündigen Infektionszeit wurden die Versuche nicht angestellt. Pfeiler erhielt durch Schütteln des Serums von Pferden 16—24 Stunden nach sehr starker Infektion und bei Kontaktwirkung mit präzipitinhaltigem Serum Niederschläge, die er auf den Gehalt des Blutes der frisch infizierten Tiere an Präzipitinogen zurückführt.

Von besonderer Wichtigkeit für die praktische Verwertbarkeit der Präzipitinreaktion war die Bereitung eines geeigneten hochwirksamen Präzipitinogens. Die Verwendung von Filtraten alter Rotzbouillonkulturen erschien uns nach den Befunden von Wladimiroff und Bonome nicht besonders geeignet. Nach den Angaben von E. Pick, Bail und Hoke war der Verwendung von Schüttelextrakten der Vorzug zu erteilen. Die Herstellung nahmen wir in der Weise vor, daß 3-tägige Glyzerinagar-Rotzkulturen mit je 3 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, die Emulsionen 12 und 24 Stunden bei 37° geschüttelt und sodann durch Chamberlandkerzen filtriert wurden. Eigentümlicherweise befriedigte die

Prüfung der präzipitogenen Eigenschaft dieser Schüttelextrakte nicht bei der Kontaktwirkung mit dem Serum eines nach 14-tägiger Rotzkrankheit verbluteten Meerschweinchens (Agglutinationstiter 1:2000) als auch bei der Berührung mit den Rotzimmunsera zweier Kaninchen (Agglutinationstiter 1:100 000 und 1:200 000). In den Röhrchen mit dem Serum des rotzigen Meerschweinchens entstand bei Ueberschichtung mit den Schüttelextrakten an der Schichtgrenze erst nach 30 Minuten langem Verweilen bei 37° eine nur schwache Trübung, die nach 24 Stunden weiter bestand und kein Präzipitat in der Kuppe der Eprouvete abgesetzt hatte. Die Ueberschichtung der Rotzimmunsera von 2 Kaninchen ergab nach einer halben Stunde an der Schichtgrenze eine Ringandeutung mit zunehmender azendierender diffuser Trübung des Antigens, so daß nach Ablauf einer Stunde die ganze obere Hälfte der Flüssigkeitssäule stark getrübt war. Bei Kontakt mit Serum rotzfreier Pferde erzeugte das filtrierte Schüttelextrakt nach Ablauf einer Stunde eine schwache Trübung an der Schichtgrenze, die längere Zeit ohne Präzipitatzbildung bestehen blieb.

Wurde statt des Schüttelextraktfiltrates ein Filtrat verwendet, das aus einer gleichen Bacillenemulsion gewonnen worden war, die aber ohne Behandlung im Schüttelapparat nur 24 Stunden bei 37° gestanden hatte, so ergaben die gleichen Sera einen wesentlich befriedigenderen Ablauf der Reaktionen. Bei Verwendung dieses Filtrates entstand im Serum des rotzigen Meerschweinchens bereits nach 5 Minuten ein sehr schöner scharfer Ring, der während einer Stunde an Stärke zunahm, worauf Ausflockung erfolgte und nach 24 Stunden unter Aufhellung der Flüssigkeitssäule ein schleierartiges Präzipitat in der Kuppe des Glases bemerkbar war. In den Rotzimmunsera der beiden Kaninchen entstanden momentan sehr deutliche Ringe sowie langsam folgend aufsteigende Trübung des Präzipitinogens. In der Glaskuppe befand sich nach 24 Stunden reichliches Präzipitat. In drei Normalpferdesera bewirkte das Filtrat nach 10—15 Minuten eine schwache Trübung an der Schichtgrenze, die auch nach Ablauf von 24 Stunden noch vorhanden war, während in der Glaskuppe sich kein Präzipitat befand.

Wir fanden schon präzipitinogen wirkende Filtrate, nachdem die Bacillenemulsionen nur 1 Stunde bei 37° gestanden hatten.

Aus diesen Versuchen ergibt sich mithin, daß für den Präzipitinnachweis vermittels des Schichtungsverfahrens die Filtrate nicht geschüttelter Bacillenemulsionen geeigneter sind als Schüttel-extraktfiltrate.

Es entstand nun die weitere Frage, zu welchem Zeitpunkt eine Rotzbacillenemulsion den größten Gehalt an Präzipitinogen besitzt.

Die Beantwortung dieser Frage mußte durch ein gewissermaßen quantitativ arbeitendes Verfahren erfolgen dergestalt, daß die präzipitinogene Wirkung der Filtrate verschieden alter aber gleichstarker Bacillenemulsionen in steigenden Verdünnungen gegen ein rotzpräzipitinhaltiges Standardserum austitriert wurde. Hierzu verfahren wir folgendermaßen: Es wurde eine Anzahl Glyzerinagarröhrchen mit gleichgroßer Oberfläche des Nährbodens mit Rotz geimpft, die Kulturen 3 Tage bei 37° belassen und in jedes Röhrchen 5 ccm physiologische Kochsalzlösung hinzugegeben. Die luftdicht verschlossenen Röhrchen blieben dann, soweit dieselben nicht schon geprüft wurden, bis zu 14 Tagen im Brütoven und kamen dann zur weiteren Aufbewahrung in den Eisschrank. Nach den aus der Tabelle ersichtlichen Zeiten wurde die Emulsion je zweier Röhrchen durch eine Chamberlandkerze filtriert und das Filtrat auf seine präzipitinogene Wirkung geprüft. Den Belag des Nährbodens als Einheit für die Bacillenmenge genommen, bezeichne ich die Konzentration des Filtrates dieser Röhrchen mit 1:5. Diese Filtrate sind schon nach 1—2-tägigem Stehenlassen der Bacillenemulsionen so präzipitinogenhaltig, daß dieselben beim Kontakt mit hochwertigen präzipitinhaltigen Seris momentan eine positive Reaktion bewirken. Die jeweiligen 1:5 Filtrate wurden nun auf 1:50 und 1:100 verdünnt und dann die Zeitdauer bis zum Kenntlichwerden der Reaktion beim Kontakt mit dem Standardserum bestimmt. Als Standardserum diente das Serum eines 11 Tage nach der Infektion ( $\frac{1}{200}$  Oese Rotzkultur intraperitoneal) aus der Carotis verbluteten Meerschweinchens mit einem Agglutinationstiter von 1:2500.

Tabelle V.

Alter der Bacillen-emulsion	Verdünnung des Filtrates der Bacillen-emulsion	Ablauf der Reaktion			
24 Std.	1:10	scharfer	Ring	nach 4 Min.	
2 Tage	1:50	schwacher	"	20 "	
	1:50	"	"	15 "	
	1:100	"	"	30 "	schwache Trübung an der Schichtgrenze
4 "	1:50	deutlicher	"	5 "	
6 "	1:100	"	"	15 "	dgl.
	1:50	"	"	5 "	
12 "	1:100	"	"	10 "	dgl.
	1:50	"	"	1 "	
14 "	1:100	"	"	10 "	deutlicher Ring an der Schichtgrenze
	1:50	"	"	1 "	
17 "	1:100	"	"	10 "	dgl.
	1:50	"	"	1 "	
22 "	1:100	"	"	10 "	dgl.
	1:50	"	"	1 "	
30 "	1:100	"	"	10 "	dgl.
	1:50	"	"	1 "	
45 "	1:100	"	"	10 "	schwacher Ring an der Schichtgrenze
	1:50	schwacher	"	1 "	
60 "	1:100	"	"	10 "	dgl.
	1:50	"	"	1 "	
	1:100	"	"	10 "	dgl.

Für die Herstellung größerer Mengen von Filtrat verwenden wir Rouxsche Flaschen, deren Glycerinagarbelag mit 20 ccm physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt wird. Die Rouxschen Flaschen bieten den Vorteil, daß die Bacillenemulsion längere Zeit aufbewahrt werden kann und frisches, stark präzipitinogenhaltiges Filtrat somit stets schnell in größerer Menge zur Hand ist.

Die Filtrate aus den Rouxschen Flaschen erwiesen sich in ihrer präzipitinogenen Eigenschaft nach 30—60-tägiger Aufbewahrung in Bacillenemulsion etwa viermal so stark als die in der Tabelle angegebenen Filtrate. Filtrate, welche nach 90-tägiger Aufbewahrung der Bacillenemulsionen gewonnen worden waren, zeigten ein deutliches Abflauen der präzipitinogenen Wirkung, dergestalt, daß diese Filtrate sich in ihrer Wirkung ähnlich wie Schüttelextrakte verhielten.

Der Präzipitinogengehalt nimmt demnach in Rotzbacillenemulsionen bei Brutwärme bis zum 12. Tage zu und hält sich dann eine Zeitlang auf

gleicher Höhe. Vom 30. Tage ab setzt eine leichte Verminderung der präzipitinogenen Wirkung der Filtrate ein, die jedoch hinsichtlich der Verwendbarkeit der Filtrate bis zum 60. Tage der Aufbewahrung der Bacillenemulsionen ohne praktische Bedeutung ist.

Konservierende Zusätze fügen wir den Bacillenfiltraten nicht zu, da die Bacillenemulsionen längere Zeit haltbar bleiben und trüb gewordene Filtrate beim Vorrätighalten der Emulsionen in den Kulturgläsern gegebenenfalls schnell durch frische Filtrate ersetzt werden können.

Gebrauchte Chamberlandkerzen geben häufig gelb gefärbte Filtrate von den Bacillenemulsionen. Es empfiehlt sich daher die Kerzen zuvor mit Kochsalzlösung zu durchspülen.

#### Zusammenfassung.

Die Rotzkrankheit der Tiere kann intra vitam durch den Nachweis der Rotzpräzipitine im Blutserum nachgewiesen werden.

Durch das Auftreten von Normalpräzipitinen kann die einwandsfreie Beurteilung der Präzipitine im Anfangsstadium der Präzipitinbildung erschwert werden.

Bei der praktischen Verwertung der Präzipitinreaktion ist daher auf den typischen Verlauf der Reaktion besonderes Gewicht zu legen, bestehend bei der Schichtprobe in baldigem Auftreten eines scharfen, schnell an Stärke zunehmenden Ringes, welcher nach 24 Stunden unter völliger oder starker Aufhellung der Flüssigkeitssäule ein schleierförmiges Präzipitat absetzt.

Die Normalpräzipitine unterscheiden sich von den spezifischen Präzipitinen durch das spätere und schwächere Auftreten an der Schichtgrenze, durch die meist fehlende Präzipitatbildung und das Persistieren der Trübung über 24 Stunden hinaus.

Beim rotzig infizierten Meerschweinchen kann die Präzipitinreaktion vom 4.—6. Tage ab als einwandsfrei angesehen werden. Die Befunde von Präzipitinen in den 3 ersten Tagen können nach den bisherigen Erfahrungen über die Entstehung des Doppelringphänomenes gleichfalls als spezifische Reaktionen aufgefaßt werden, sofern in dieser Zeit Doppelringe konstant und typisch in Erscheinung treten.



Da das Doppelringphänomen während des Bildungsstadiums der Präzipitine beobachtet wird, kann aus dem Doppelringbefund bei der praktischen Verwertung der Präzipitinreaktion zur Rotzdiagnose die Folgerung gezogen werden, daß das betreffende Tier sich noch im Anfangsstadium der Rotzkrankheit befindet.

Beim Kaninchen indiziert die Präzipitinreaktion infolge des Mangels an Normalpräzipitinen die erfolgte Infektion in einwandsfreier Weise dergestalt, daß hier auch schwache Reaktionen ohne Präzipitatbildung und Aufhellung nach 24 Stunden als spezifische Reaktionen anzusehen sind.

Beim rotzigen Meerschweinchen steigt zuerst der Präzipitingehalt des Blutes schnell nachweisbar an; der Agglutinationstiter geht dann erst in die Höhe, nachdem die Präzipitinreaktion bereits als einwandsfrei anzusehen ist.

Beim rotzig infizierten Kaninchen steigt zuerst der Gehalt des Serums an Agglutininen, während die Präzipitine hier wesentlich langsamer in Erscheinung treten.

Diese beim Meerschweinchen und Kaninchen umgekehrt sich verhaltenden Beobachtungen in der Bildung von Präzipitinen und Agglutininen sprechen gegen die völlige Identität dieser Immunkörper bei Rotz.

Die von Fukuhara aufgestellte Behauptung, „daß die Ringprobe allein, wenn nicht auch Mischproben gemacht werden, gar keinen Schluß auf spezifische Präzipitine oder Präzipitinogene erlaubt“, ist als hinfällig zu betrachten, da Fukuhara nicht den Nachweis erbracht hat, daß parallel mit der Bildung nichtspezifischer Ringe bei Schichtprobe jedwede Trübungen bei gleichzeitiger Vornahme der Mischprobe ausbleiben.

Nach unseren Befunden können vielmehr sowohl bei der Schicht- als auch der Mischprobe in Uebereinstimmung mit mehrfachen bestätigenden Angaben in der Literatur durch die Anwesenheit von Normalpräzipitinen (Heteropräzipitine, Kraus; Autopräzipitine, Ascoli) nichtspezifische Trübungen entstehen, welche die einwandsfreie Bewertung spezifischer Trübungen bei schwachem Ablauf der Reaktion erschweren.

Die Schichtprobe vermag den Ablauf von Reaktionen in höherem Maße objektiv zu indizieren als die Mischprobe. In-

folge ihrer Feinheit hat sie den Nachteil, daß sie auch den schwachen Gehalt an Normalpräzipitinen leichter kenntlich macht als die Mischprobe.

Diesem Nachteil ist aber andererseits der Vorteil gegenüberzustellen, daß die Schichtprobe bei Abwesenheit von Normalpräzipitinen auch die schwächsten Grade spezifischer Reaktionen in höherem und weitgehendem Maße als die Mischprobe objektiv kenntlich zu machen vermag.

Für die Präzipitinreaktion als diagnostisches Verfahren eignen sich bei der Ringprobe am besten die Filtrate nichtgeschüttelter Bacillenemulsionen.

Der Präzipitiningehalt der Rotzbacillenemulsion nimmt ungeschüttelt bei 37° bis zum 12. Tage zu und hält sich bei der weiteren Aufbewahrung der Emulsion im Eisschrank längere Zeit auf annähernd gleicher Höhe.

#### Literatur.

- Müller, M., Berliner tierärztl. Wochenschr., 1908, No. 34.  
Pfeiler, W., Arch. f. wissenschaftl. u. prakt. Tierheilkunde, 1909, p. 323.  
Deduilin und Wladimiroff, zitiert nach Wladimiroff in Kolle-Wassermann, Bd. 4.  
Bonome, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 38, 1905.  
Ascoli, Münch. med. Wochenschr., 1903.  
Fornet, Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 38.  
Fornet, Schereschewsky, Eisenzimmer und Rosenfeldt, Deutsche med. Wochenschr., 1907, No. 41.  
Fornet und Müller, Zeitschr. f. biol. Technik u. Methodik, Bd. 1, 1908.  
Kraus in Kolle-Wassermann, Bd. 4.  
Kraus und v. Pirquet, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 32, 1902.  
Paltauf, Deutsche med. Wochenschr., 1903, No. 50 und in Kolle-Wassermann, Bd. 4.  
Wassermann, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 42, 1903.  
Radziewsky, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 34, 1900.  
Bail, Arch. f. Hygiene, Bd. 42, 1902.  
Bail und Weil, Centralbl. f. Bakt., Bd. 42, 1906.  
Pick, Hofmeisters Beitr. z. chem. Phys. u. Pathol., Bd. 1, 1902.  
Gaethgens, Centralbl. f. Bakt., Bd. 48, 1908.  
Hoke, Wiener klin. Wochenschr., Jahrg. 20, 1907.  
Plaut und Rossi, Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 2.  
Fukuhara, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 2, 1909.  
Mießner, Centralbl. f. Bakt., Bd. 51, Heft 2.

*Nachdruck verboten.***Einwirkung von Kaltblüterpassagen auf Nagana- und Lewisi-Trypanosomen.**

Von Prof. H. Wendelstadt und T. Fellmer.

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. Juli 1909.)

Nagana- und Lewisi-Trypanosomen verändern sich in Virulenz und Form, wenn sie durch einen Kaltblüter getrieben werden. Auf die Formveränderungen wollen wir in dieser Arbeit nur flüchtig eingehen. Wir werden sie in einer späteren Publikation veröffentlichen mit Zeichnungen, mit deren Anfertigung wir jetzt beschäftigt sind. Die Virulenzveränderungen, die wir beobachteten, waren recht erhebliche. Z. B. wurde ein Naganastamm, der sonst in 5—7 Tagen Ratten tötete, nach Kaltblüterpassagen so bösartig, daß er schon nach nicht ganz 2 Tagen tötete. Ein Lewisistamm wurde für weiße Ratten tödlich. Wir konnten dies in 7 aufeinanderfolgenden Rattenpassagen feststellen. Ob es gelingen wird, einen dauernd für weiße Ratten tödlichen Lewisistamm zu züchten, ist noch nicht entschieden. Die Entwicklung der Trypanosomen, die eine Kaltblüterpassage durchgemacht hatten, war nachher im Warmblüter eine bedeutend schnellere. Sie erschienen in kürzerer Zeit nach der Infektion, als wir es früher beobachtet hatten. Nagana-Trypanosomen traten schon nach 4, Lewisi-Trypanosomen nach 7 Stunden auf.

Versuche, Nagana-Trypanosomen durch Kaltblüter zu treiben und dann nach dieser Passage in Ratten weiter zu züchten, begannen wir im Frühjahr 1907, nachdem wir schon einige Jahre vorher ohne Erfolg versucht hatten, Axolotl zu infizieren. Bei Eidechsen und Ringelnattern gelangen uns die ersten Versuche<sup>1)</sup>. Ein Jahr ließen wir dann diese Arbeit bis zum Oktober 1908 ruhen, da wir mit anderen Experimenten beschäftigt waren. Dann nahmen wir sie in größerem

1) Wendelstadt, Vorträge bei dem Akademischen Vortrags- und Demonstrationsabend in Düsseldorf am 28. Juli 1908 und 4. März 1909 in der mediz. Klinik referiert.

Maßstabe auf, da nach den ersten Resultaten eine weitere Verfolgung der Sache berechtigt erschien.

Da wir damit rechnen mußten, daß unter Umständen die Kaltblüter Trypanosomenarten beherbergten, die unsere Resultate beim Ueberimpfen trüben konnten, so wurden von jedem Kaltblüter, ehe er in den Versuch genommen wurde, Blutpräparate gefärbt und in hängendem Tropfen untersucht, und eine Blutübertragung auf eine Ratte gemacht, die dann einen Monat lang beobachtet wurde. Erst nachdem diese Untersuchungen negativ ausgefallen waren, arbeiteten wir mit dem Kaltblüter weiter. In keinem Falle konnte vor der Behandlung eine Infektion von Ratten erzielt werden. Wir benutzten stets mittelgroße weiße Ratten. Die Impfung der Kaltblüter wurde in die Bauchhöhle mit unverdünntem trypanosomenhaltigem Blute (meist ca. 1 ccm) gemacht. Die Ratten wurden intraperitoneal mit einigen Tropfen des Kaltblüterblutes, die mit 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt waren, geimpft. Das Blut entnahmen wir den Kaltblütern aus der Schwanzspitze oder mit einer feinen Spritze aus dem Herzen oder das Tier wurde, um größere Mengen zu gewinnen, entblutet. Versuche machten wir mit Ringelnattern, Schildkröten, Fröschen, Eidechsen, Blindschleichen, Erdmolchen und Tritonen. Die Tritonen mußten wir ausscheiden, da deren Blut von den Ratten nicht vertragen wurde.

Als Impfmateriel diente ein virulenter Naganastamm, den uns vor längerer Zeit das Institut für Infektionskrankheiten in Berlin freundlichst überlassen hatte, und ein Lewisistamm, den wir der Güte des Herrn Geheimrat Ehrlich in Frankfurt verdanken. Der Naganastamm ist seit langer Zeit nur in Ratten weitergezüchtet worden und tötet Ratten in 5—7 Tagen. Die längere Züchtung in Ratten ist für die vorliegenden Versuche von Bedeutung, da die zur längeren und bequemeren Erhaltung des Stammes beliebte Meerschweinchenpassage eine Abschwächung der Virulenz herbeiführt, die sich erst nach längerer Rattenpassage ausgleicht. Auf das Befinden einzelner Arten der infizierten Kaltblüter hat die Temperatur, in der sie gehalten werden, anscheinend einen Einfluß. Ringelnattern und Eidechsen vertrugen die Impfung mit Lewisi-Trypanosomen in Zimmertemperatur meist gut, selbst eine mehrfach

wiederholte starke Infektion schädigte sie anscheinend nicht. Die geimpften Tiere befanden sich bei einer Temperatur von  $37^{\circ}$  weniger gut. Bei Naganainfektion magerten Nattern und Eidechsen schnell ab und starben nach einigen Wochen, wenn sie in Zimmertemperatur gehalten wurden, im Brutschrank bei  $37^{\circ}$  starben Nattern nicht so schnell. Keiner der Kaltblüter, die wir bis zum Ende beobachteten, und nicht vorzeitig zur Blutentnahme töteten, überlebte die Infektion mit Nagana. In dem Blute der infizierten Kaltblüter fanden sich bei mikroskopischer Untersuchung nur selten Nagana-Trypanosomen, Lewisi-Trypanosomen in keinem Falle. Wenn wir Nagana-Trypanosomen sahen, so waren sie auffallend klein und sehr beweglich. Der Unterschied gegenüber dem Ausgangsmateriale in Größe und Beweglichkeit war ein bedeutender. Wir nahmen an, daß wir hier Trypanosomen vor uns sahen, die sich in dem Kaltblüter entwickelt hatten. Impft man diese kleinen, sehr beweglichen Nagana-Trypanosomen auf Nattern, so entwickeln sich auffallend große, normal bewegliche Trypanosomen, die sich im Ausstrichpräparate viel intensiver und leichter färben (Giemsa) als die normalen, und besser differenziert erscheinen. Besonders fällt die scharfe Färbung der Geißel auf. Die Lewisi-Trypanosomen, die wir im Kaltblüter nicht finden konnten, erscheinen nach der Kaltblüterpassage besonders groß und zeigen auffallende Formveränderungen, die wir später veröffentlichen wollen. Wir konnten bei unseren letzten Versuchen eine Veränderung der Form zu einer Ähnlichkeit mit Nagana (bei Natter No. 18), die wir unter allem Vorbehalt in einem Vortrage in Düsseldorf (s. a. a. O.) erwähnten, nicht wieder beobachten. Die Veränderung der Trypanosomen im Kaltblüter tritt wohl deshalb auf, weil sie sich an das fremde, ihnen vielleicht wenig zusagende Medium anpassen müssen. In vielen Fällen gehen die Trypanosomen im Kaltblüter ganz zugrunde, so daß eine Ueberimpfung auf Ratten erfolglos bleibt. Die mikroskopische Untersuchung kann negativ ausfallen, aber doch die Uebertragung auf Ratten gelingen. Ob der negative Ausfall der mikroskopischen Untersuchung in diesem Falle darauf beruht, daß die nur in sehr geringer Anzahl vorhandenen Trypanosomen schwer aufzufinden sind, oder ob sie im Kaltblüter eine unfärbbare Dauer-

form (Cysten) angenommen haben, können wir nicht entscheiden. Auf die Cysten als Dauerform haben wir schon im Jahre 1905 hingewiesen, wo wir sie bei Ratten, die mit Brillantgrün behandelt waren, sahen<sup>1)</sup>. Später wurde auch von anderer Seite auf diese Cysten hingewiesen.

Nach unseren Beobachtungen darf nicht damit gerechnet werden, daß bei jedem Versuche die Passage durch den Kaltblüter gelingt. Es fordert oft viel Zeit, Geduld und Tiermaterial, bis ein positives Resultat erzielt wird. Wir mußten die einzelnen Trypanosomenstämme nach einiger Zeit eingehen lassen, weil das Material zur genauen Beobachtung sonst zu groß geworden wäre und der Verbrauch an Tieren sich zu sehr gesteigert hätte. Wir brauchten bisher schon ungefähr 600 Ratten. Eine erfolgreiche Ueberimpfung von Kaltblüter zu Kaltblüter ist uns niemals weder mit Lewisi noch mit Nagana geglückt, auch dann nicht, wenn in dem übergeimpften Kaltblüterblute Nagana mikroskopisch nachzuweisen war. Diese Versuche wurden gemacht mit Nattern, Schildkröten und Fröschen, und zwar von gleicher Art auf gleiche Art und von einer Art auf die andere. Nur wenn man zwischen eine geglückte Kaltblüterpassage und die Impfung eines Kaltblüters einige Rattenpassagen einschiebt, erscheint die Infektion möglich. Wir gewannen den Eindruck, daß die Trypanosomen nach mehreren Kaltblüterpassagen auch für Kaltblüter virulenter wurden.

Bei den Versuchen, die wir im folgenden anführen, haben wir die Steigerung der Virulenz nicht nach jeder Rattenpassage angegeben, sondern uns damit begnügt, die Krankheitsdauer bei der ersten Ratte und die der letzten Ratten anzugeben. Von einer Ratte wurde auf die nächste übergeimpft, wenn die mikroskopische Untersuchung ergab, daß sich sehr viele Trypanosomen im Blute befanden. Nach der Kaltblüterpassage ist zunächst bei den Ratten eine Abschwächung gegenüber der normalen Virulenz bei Nagana zu beobachten. Die erste Ratte lebt länger als eine mit normalen Nagana-Trypanosomen infizierte. Die Virulenz steigert sich aber von Ratte zu Ratte bis zum erreichbaren Maximum. Einzelne kleine

1) Kolonialkongreß 1905 und Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 52, 1906, p. 263.

Rückschläge sind immer in den Reihen. Einigemal trat der Tod bei den Ratten so unerwartet schnell ein, daß von der toten Ratte das Blut zur Impfung genommen werden mußte.

In diesem Falle trat immer ein merkliches Sinken der Virulenz der Trypanosomen ein, das sich erst nach einigen weiteren Rattenpassagen wieder ausglich.

In den folgenden Versuchen haben wir das Wort „Kaltblüterpassage“ durch die Buchstaben K.P. bezeichnet. Wenn hinter K.P. in Klammern Kaltblüter genannt sind, so bedeutet dies, daß der Trypanosomenstamm in diesem Falle schon durch die genannten Kaltblüter getrieben war. Da eine direkte Uebertragung uns nicht gelungen ist, so liegen jedesmal zwischen den genannten Kaltblüterpassagen einige Rattenpassagen. Der Buchstabe N. bedeutet, daß der betreffende Trypanosomenstamm noch keine Kaltblüter passiert hat und noch normal ist.

#### Versuche mit Ringelnattern.

##### A. Impfungen mit Nagana-Trypanosomen.

Benutzt wurden 16 Ringelnattern, teils deutsche, teils italienische.

Als Impfmateriale diente:

- a) Nagana N.,
- b) Nagana K.P.

##### a) Versuche mit Nagana N.

Natter 1. Den ersten hierhergehörigen Versuch machten wir am 24. IX. 1907 mit einem atoxylfesten Naganastamm, den uns Herr Geheimrat Ehrlich gütigst überlassen hatte. Am 30. IX. 1907 fand eine Blutübertragung auf eine Ratte statt mit positivem Erfolg. Die Ratte lebte 51 Tage, die zweite von dieser infizierte Ratte 10 Tage und die dritte von der zweiten geimpfte 9 Tage. Mehr wie drei Rattenpassagen machten wir damals nicht. Auffallend ist die lange Krankheitsdauer bei der ersten Ratte (51 Tage). In keinem unserer späteren Versuche lagen zwischen der Ueberimpfung von Kaltblüter auf die Ratte und dem Tode der Ratte mehr als 19 Tage.

Natter 2. Am 19. X. 1908 Infektion mit Nagana N. Am 21. und 22. X. fanden sich kleine Trypanosomen im Blutausschlag. Die Ueberimpfung auf eine Ratte am 22. X. brachte uns kein Resultat, da die Ratte am nächsten Tage gestorben war. Am 23. XI. 1908 wurde die Natter mit dem gleichen Stamm nochmals infiziert und ihr Blut am 25. XI. auf eine

Ratte mit Erfolg übertragen. Die erste Ratte starb nach 9 Tagen. Nach 16 Rattenpassagen war die Virulenz so gestiegen, daß die Ratten nach 3 Tagen starben. (Mit diesem Stamme wurde eine Schildkröte mit Erfolg infiziert, siehe dort.)

Natter 3. Ohne Erfolg am 25. XI. 1908 und darauf am 4. XII. 1908 geimpft mit Nagana N.

Natter 4. Am 2. XII. 1908 mit Nagana N. zum ersten Mal und am 4. XII. 1908 zum zweiten Male geimpft. Am 5. XII. fanden sich Trypanosomen im Blute, die sich bis zum 10. XII., also 6 Tage lang, nachweisen ließen. Die Ueberimpfungen auf Ratten fielen positiv aus. Die erste Ratte starb nach 13 Tagen. Durch 16 Rattenpassagen stieg die Virulenz. Die letzten Ratten starben nach 4 Tagen.

Natter 5. Infiziert mit Nagana N. am 2. XII. 1908. Am 5. XII. Ueberimpfung auf Ratte. Die erste Ratte stirbt nach 9 Tagen. Der Stamm wurde durch 26 Rattenpassagen verfolgt, er tötet zuletzt nach 2 Tagen.

Natter 6. Am 20. XII. 1908 ohne Erfolg mit Nagana N. geimpft.

#### b) Versuche mit Nagana K.P.

Natter 7. Am 24. II. 1909 ohne Erfolg mit Nagana K.P. (Natter) direkt ohne Rattenpassage geimpft (Kaltblüter auf Kaltblüter).

Natter 8. Am 30. IV. 1909 mit Nagana K.P. (Natter—Schildkröte) infiziert. Die Schlange wurde im Brutschrank bei einer Temperatur von 37° gehalten. Am 3. V. und am 4. V. werden je eine Ratte mit positivem Erfolge geimpft. Die Krankheitsdauer war 10 und 8 Tage. Der Stamm wurde nicht weiter verfolgt. Am 4. V. und am 11. V. wird die Natter mit demselben Stamm Nagana K.P. (Natter—Schildkröte) nochmals infiziert. Bis zum 19. V., also 8 Tage lang, lassen sich Trypanosomen in ihrem Blute nachweisen. Am 19. V. wird auf eine Ratte übergeimpft. Die erste Ratte stirbt nach 19 Tagen, die zweite nach 4 und die dritte nach 1½ Tagen. Die Krankheitsdauer war so unerwartet schnell abgekürzt worden, daß die dritte Ratte schon tot war, als ihr Blut auf die vierte übertragen wurde. Wenn von einer Ratte erst nach dem Tode die Ueberimpfung gemacht wird, zeigt sich immer ein Rückgang der Virulenz. Dieser Stamm wurde weiter durch 20 Rattenpassagen getrieben. Die kürzeste Krankheitsdauer war 2 Tage 2 Stunden.

Bei diesem Stamme fanden sich bei Ratten schon 4 Stunden nach der Infektion vereinzelte Trypanosomen bei mikroskopischer Untersuchung. 5 Stunden nach der Infektion traten schon Teilungsformen auf. Bei normalen Nagana-Trypanosomen fanden wir erst 2 Tage nach der Infektion im Blute der Ratte die ersten Trypanosomen.

Natter 9. Der Versuch wurde am 30. IV. 1909 begonnen und in gleicher Weise wie bei Natter 8 mit Nagana K.P. (Natter—Schildkröte) durchgeführt. Nur wurde die Schlange nicht bei 37°, sondern bei Zimmertemperatur gehalten. Kein Erfolg.

Natter 10. Infektion mit Nagana K.P. (Natter—Schildkröte) war ohne Erfolg. Der Versuch wurde am 19. V. 1909 begonnen. Die Schlange



wurde bei 37° gehalten. Die Natter war vorher mehrfach ohne Erfolg mit Lewisi N. geimpft worden.

Natter 11. Am 22. V. 1909 wurde die Schlange mit Nagana K.P. (Natter—Schildkröte—Natter) geimpft und bei 37° gehalten. Am 23. V. waren Trypanosomen im Blute. Um viel Blut zur Ueberimpfung auf Ratten zu erhalten, wurde die Natter am 24. V. entblutet. Die Ueberimpfungen auf Ratten fielen positiv aus. Die erste Ratte starb nach 7 Tagen. Es wurden nur 6 Rattenpassagen gemacht. Die letzten Ratten starben nach 3 Tagen.

Natter 12. Der Versuch wurde ebenso gemacht wie bei Natter 11, aber bei Zimmertemperatur. Er fiel negativ aus. Die Natter wurde am 8. VI. 1909 noch einmal mit 2 ccm Blut vom gleichen Stamm infiziert und dann im Brutschrank gehalten. Am 9. VI. wurde sie entblutet und ihr Blut auf einen Frosch und eine Eidechse, und auf Natter 14 ohne Erfolg übertragen (Kaltblüter auf Kaltblüter).

Natter 13. Die Schlange wurde von Natter 12 vor deren zweiter Infektion am 2. VI. 1909 geimpft und bei 37° gehalten ohne Erfolg (Kaltblüter auf Kaltblüter).

Natter 14 wurde von Natter 12 übergeimpft am 9. VI. 1909 und bei 37° gehalten (s. Natter 12). Kein Erfolg (Kaltblüter auf Kaltblüter).

Natter 15. Die Natter wurde mit Nagana K.P. (Natter—Schildkröte—Natter—Eidechse) direkt ohne dazwischen liegende Rattenpassage geimpft und bei 37° gehalten. Kein Erfolg (Kaltblüter auf Kaltblüter).

Natter 16. Die Natter wurde am 17. VII. 1909 mit Nagana N. geimpft und bei 37° gehalten. Im Blute finden sich vom 20. VII. 1909 bis zum 29. VII., also 12 Tage lang kleine Trypanosomen. Die Ueberimpfungen auf Ratten waren positiv. Die erste Ratte starb nach 9 Tagen. Es wurden bis jetzt 11 Rattenpassagen gemacht. Die letzten Ratten starben nach 2½ und nach 1 Tag und 22 Stunden.

### B. Ueberimpfungen mit Lewisi-Trypanosomen.

Bei 12 Ringelnattern, teils deutschen, teils italienischen, wurden Versuche gemacht:

- a) Lewisi N.,
- b) Lewisi K.P.

#### a) Versuche mit Lewisi N.

Natter 17 und Natter 18 wurden in gleicher Weise mit Lewisi N. am 13. I. 1909 injiziert. Wir konnten niemals durch mikroskopische Untersuchungen Lewisi-Trypanosomen im Blute der Nattern nachweisen. Auch bei keinem der anderen Versuche ist uns dies gelungen. Eine Ueberimpfung von Natter 18 auf eine Ratte am 19. I. 1909 vor der unten erwähnten neuen Infektion der Schlange verlief positiv. Die Ratte starb nach 9 Tagen. Weitere Ueberimpfungen wurden damals von dieser Ratte nicht gemacht. Am 19. I. 1909 wurden beide Nattern nochmals infiziert. Am 28. I. 1909 wurde von Natter 18 nochmals auf eine Ratte übergeimpft. Die Ratte

starb nach 10 Tagen. Von dieser Ratte aus wurde der Stamm durch 24 Rattenpassagen getrieben. Die Ratten starben meist nach 4 Tagen, einige nach 3 und  $2\frac{1}{2}$  Tagen. Der Stamm konnte aus äußeren Gründen nicht weiter verfolgt werden. Von Natter 17 wurde am 30. I. 1909, also zwei Tage nach der zweiten Infektion, eine Ratte geimpft. Der Stamm war für Ratten nicht pathogen geworden. Bei 6 Rattenpassagen behielt er die Kennzeichen eines normalen Lewisistammes.

Alle weiteren erneuten Infektionen der beiden Nattern mit Lewisi N. blieben erfolglos.

Natter 19 wurde am 3. II. 1909 ohne Erfolg mit Lewisi N. infiziert.

Natter 20 wurde am 24. II. 1909 und Natter 21 am 27. IV. 1909 erfolglos mit Lewisi N. geimpft.

Natter 22 wurde am 18. V. 1909 mit Lewisi N. geimpft und bei  $37^{\circ}$  gehalten.

Natter 23 wurde ebenso behandelt, aber bei Zimmertemperatur gehalten. Bei beiden kein Erfolg.

Natter 24. Am 18. VI. 1909 wurde mit Lewisi N. infiziert und die Natter bei  $37^{\circ}$  gehalten. Eine Ueberimpfung des Blutes tötete eine Ratte und die tödliche Wirkung erhielt sich durch 6 Rattenpassagen, ohne daß es uns gelang, in den Ratten Trypanosomen nachzuweisen, so daß wir nicht wissen, ob die Todesursache in einer Trypanosomeninfektion zu suchen ist.

Natter 25. Am 18. VI. 1909 ebenso infiziert wie Natter 24. Sie wurde bei Zimmertemperatur gehalten. Eine Ueberimpfung am 19. VI. 1909 auf Ratten ergab einen für Ratten pathogenen Stamm. Die erste Ratte starb nach 15 Tagen, die zweite nach 9, die dritte nach 5 und die folgenden drei Ratten nach 4 Tagen. Es war von Ratte zu Ratte übergeimpft worden. Nach der 8. Rattenpassage läßt die Virulenz nach. Die 9. Ratte starb nicht; auch weitere Ueberimpfungen verliefen nicht mehr tödlich. Ob es gelingen wird, einen Lewisistamm K.P. dauernd pathogen für Ratten zu züchten, können wir heute noch nicht entscheiden. Die Lewisi-Trypanosomen waren in den Ratten sehr groß geworden und zeigten besonders eine große Verlängerung am hinteren Ende. Bei der 5. Ratte fanden sich schon nach 7 Stunden die ersten Lewisi-Trypanosomen im Blute, während sich bei dem Lewisi-N.-Stamm, von dem wir ausgegangen waren, erst 3 Tage nach der Infektion vereinzelte Trypanosomen bei der Ratte zeigten. Mit dem hier gezüchteten, für Ratten pathogenen Stamm (Stamm Lewisi K.P.) wurde ein Frosch erfolgreich infiziert (s. Froschversuche).

#### b) Versuche mit Lewisi K.P.

Natter 26 wurde mit Lewisi K.P. (Natter 18) am 29. II. 1909 ohne Erfolg geimpft.

Natter 27 wurde am 29. VI. 1909 ohne Rattenpassage mit Lewisi K.P. (Natter 10) geimpft und bei  $37^{\circ}$  gehalten (Kaltblüter auf Kaltblüter). Ohne Erfolg.

Natter 28 ebenso behandelt, bei Zimmertemperatur. Kein Erfolg (Kaltblüter auf Kaltblüter).

### Versuche mit Eidechsen.

Es wurden 10 Eidechsen, teils gewöhnliche graue, teils grüne, teils mexikanische Smaragdeidechsen verwandt. Den ersten Versuch machten wir im Jahre 1907. Zur Infektion wurden benutzt:

- a) Nagana N.,
- b) Nagana K.P.,
- c) Lewisi N.

Nur zwei Versuche fielen positiv aus.

I. Eine grüne mexikanische Smaragdeidechse wurde am 14. VI. 1907 mit Nagana N. infiziert. Es fanden sich im Blutausschlag keine Trypanosomen. In den nächsten Tagen wurden zwei weitere Infektionen gemacht und 10 Tage nach der dritten Infektion fiel eine Ueberimpfung auf Ratten positiv aus. Die Ratte starb nach 13 Tagen, die nächste nach 10 Tagen. Damals wurde der Stamm nicht weiter verfolgt.

a) Die Eidechsen 2—7 wurden, nachdem am 15. IX. 1908 die Versuche wieder aufgenommen waren, mit Nagana N. ohne Erfolg geimpft.

b) Eidechse 9 wurde am 8. VI. 1909 mit Nagana K.P. (Natter—Schildkröte) infiziert und am nächsten Tage getötet. Im Blutausschlag fanden sich auffallend kleine Trypanosomen, die sich im hängenden Tropfen sehr beweglich zeigten. Das Blut war für Ratten infektiös. Die erste Ratte starb nach 4 Tagen. Nach 8 Rattenpassagen tötete der Stamm nach  $2\frac{1}{4}$  Tagen Ratten.

Eidechse 10 wurde ohne Erfolg mit Nagana-trypanosomenhaltigem Blute von Natter 11 geimpft. Die Uebertragung von Kaltblüter auf Kaltblüter ohne Rattenpassage mißlang.

c) Eidechse 8 wurde am 4. XII. 1908 erfolglos mit Lewisi N. geimpft.

Eine starke Virulenzsteigerung ergab der Versuch mit Nagana K.P. Hier trat schon bei der ersten Ratte ein schneller Tod in 4 Tagen ein. Wahrscheinlich würde der Versuch im Jahre 1907 auch eine Virulenzsteigerung ergeben haben, wenn die Rattenüberimpfungen nicht zu früh abgebrochen worden wären.

### Versuche mit Schildkröten.

Von den Versuchen mit 10 europäischen Sumpf-Schildkröten fiel nur einer positiv aus. Die intraperitoneale Infektion ist bei Schildkröten schwierig auszuführen, so daß ein Mißerfolg leicht eintreten kann. Aus dem Schwanz der Tiere

läßt sich nur sehr wenig Blut zu Ueberimpfungen auf Ratten gewinnen. Der negative Erfolg bei 90 Proz. der Tiere läßt sich aus diesen Schwierigkeiten vielleicht erklären, und man braucht nicht eine besondere Widerstandskraft der Schildkröten gegen die Infektion daraus zu folgern. Wir benutzten:

- a) Nagana N.,
- b) Nagana K.P. (Natter),
- c) Lewisi N.

Wir führen nur zwei von den Versuchen hier an.

a) Nagana N wurde am 21. I. 1909 der Schildkröte I injiziert mit negativem Erfolg. Am 2. III. 1909 erneute Infektion mit Nagana K.P. (Natter—Schildkröte II) ebenfalls negativ. Es gelang nicht, auf die schon einmal infizierte Schildkröte Nagana K.P. zu impfen (Kaltblüter direkt auf Kaltblüter).

b) Am 22. I. 1909 wurde Schildkröte II mit Nagana K.P. (Natter) infiziert ohne Erfolg. Am 24. II. 1909 hatte eine Impfung mit demselben Trypanosomenstamm Erfolg. Am 26. II. 1909 finden sich sehr bewegliche Trypanosomen im Blute. Eine Ueberimpfung auf eine Ratte am 27. II. 1909 tötete die Ratte in 14 Tagen. Durch 21 Rattenpassagen hatte der Nagana-stamm eine solche Virulenz erreicht, daß er mehrfach in 2 $\frac{1}{2}$  Tagen Ratten tötete. Am 3. III. 1909 wurde die Schildkröte, die sehr schwach erschien, getötet und ihr Blut auf eine Ratte mit positivem Erfolge geimpft. Diese Ratte starb nach 11 Tagen. Nach einer Passage durch 20 Ratten tötete der Stamm wiederholt schon nach 2 Tagen.

Diese Schildkröte II war, wie schon oben gesagt, die einzige, welche uns ein Resultat gab. Die Virulenzsteigerung war bei diesem Versuche eine bedeutende.

#### Versuche mit Erdmolchen.

Von unseren Versuchen mit 5 Erdmolchen weist nur einer ein positives Resultat auf.

Zum Infizierungsmaterial benutzten wir:

- a) Nagana K.P.,
- b) Lewisi N.

a) Versuch vom 5. V. 1909. Das Blut eines Erdmolchs, der 3mal mit Nagana K.P. (Natter—Schildkröte) infiziert worden war, wurde 2 Tage nach der letzten Infektion auf eine Ratte übergeimpft. Die erste Ratte starb nach 10 Tagen, die zweite nach 4 Tagen. Nur 2 Rattenpassagen. Die zweite Ratte starb so unerwartet schnell, daß die Ueberimpfung nicht rechtzeitig gemacht wurde. Der Stamm ging dadurch verloren.

Drei weitere gleiche Versuche ergaben kein Resultat.

b) Lewisi N. auf Erdmolche zu übertragen ist uns nicht gelungen.

### Versuche mit Fröschen.

Im ganzen wurde mit 12 Fröschen, teils braunen, teils grünen gearbeitet. Als Infektionsmaterial wurde benutzt:

- a) Nagana N.,
- b) Nagana K.P.,
- c) Lewisi N.,
- d) Lewisi K.P.

a) Mit Nagana N. erhielten wir keine positiven Resultate.

b) Eine Impfung am 8. VI. 1909 mit hochvirulenten Nagana K.P. (Natter—Schildkröte—Natter, Stamm 76) ging an. Nach 4 Tagen waren Trypanosomen im Blute nachweisbar. Am 12. VI. 1909 nochmalige Infektion mit dem gleichen Naganastamm. 4 Tage später wurde der Frosch getötet und sein Blut auf Ratten übergeimpft. Es wurde eine Passage durch 9 Ratten gemacht. Die erste Ratte starb nach 7 Tagen, die vierte überlebte die Infektion nur 1 Tag und 22 Stunden. Dadurch, daß 3mal von einer toten Ratte übergeimpft werden mußte, ging die Virulenz zuletzt auf eine Krankheitsdauer von 3 Tagen zurück.

Mit diesem virulenten Stamm impften wir am 6. VII. 1909 einen Frosch ohne Erfolg. Nagana K.P. (Natter—Frosch).

c) Lewisi N. konnten wir nicht auf Frösche übertragen.

d) Unter mehreren Versuchen gelang es uns einmal (Versuch vom 7. VII. 1909), einen Lewisistamm K.P. (Natter, Stamm 26), der für Ratten pathogen geworden war, auf einen Frosch zu übertragen und von ihm auf Ratten überzuimpfen. Der Trypanosomenstamm, der vorher für Ratten pathogen war, war nach der Froschpassage für Ratten unschädlich geworden; wenigstens wurden 4 Ratten, in deren Blut Trypanosomen nachweisbar waren, die nacheinander geimpft wurden, wieder gesund. Diese Lewisi-Trypanosomen sind auffallend groß und sehr leicht färbbar (Giemsa).

Ohne Erfolg waren unsere Versuche mit Nagana- und Lewisi-Trypanosomen bei Blindschleichen und Tritonen.

### Zusammenfassung.

Durch die Passage durch Kaltblüter wird die Virulenz von Nagana- und Lewisi-Trypanosomen für Ratten gesteigert und die Formen der Trypanosomen erleiden eine Veränderung.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der experimentellen Abteilung des Instituts für Hygiene  
und experimentelle Therapie zu Marburg.]

**Eine einfache Methode der Diphtherieserumbewertung.**

Von Professor Paul H. Römer und Rudolf Somogyi (Budapest).

(Eingegangen bei der Redaktion am 6. August 1909.)

Nach der amtlichen Prüfungsvorschrift für die Bewertung des Diphtherieserums geht man bei der Einstellung eines für den Handel bestimmten Präparates von der festgelegten und im Frankfurter Institut für experimentelle Therapie unter allen Kautelen konservierten Immunisierungseinheit (IE.) aus. Man bestimmt von einem gegebenen Gift diejenige Menge, welche, nach Mischung mit 1 D. Immunisierungseinheit einem Meer-schweinchen von mittlerem Gewicht subkutan injiziert, das Versuchstier nach 4 Tagen an typischer Diphtherieintoxikation zugrunde gehen läßt. Die ermittelte Giftdosis bezeichnet man als  $L_{\dagger}$ -Dosis. Gegenüber dieser  $L_{\dagger}$ -Dosis prüft man dann das zur Prüfung übersandte Serum, indem man diejenige Menge desselben ermittelt, welche in Mischung mit der  $L_{\dagger}$ -Dosis des Testgiftes dasselbe leistet wie die amtlich festgelegte Immunisierungseinheit. Nach dieser Feststellung ergibt sich der Antitoxingehalt des geprüften Serums auf Grund einer sehr einfachen Berechnung.

Es ist bekannt, mit welcher Präzision bei exakter Ausführung diese Prüfungsmethode arbeitet. Wenn wir im folgenden eine neue Prüfungsmethode vorschlagen, so soll damit nicht zum Ausdruck gebracht werden, daß die amtliche Prüfungsmethode einer Verbesserung bedarf. Die von uns angewandte Bewertungsmethode dürfte trotzdem aber für manche Laboratorien willkommen sein, da sie die bei der bisherigen Methode unvermeidlichen und — wenn sie exakt sein sollte — recht beträchtlichen Tieropfer vermeidet, ohne wesentlich an Genauigkeit einzubüßen. Den Beweis hierfür zu liefern, ist die Aufgabe dieser Mitteilung.

Nachdem der eine von uns [Römer<sup>1)</sup>] gezeigt hat, daß das Diphtheriegift bei intrakutaner Injektion eine charakteristische Giftwirkung hat, welche sogar noch von minimalen Mengen desselben hervorgerufen wird, konnte diese intrakutane Injektionsmethode von Römer und Sames<sup>2)</sup> mit Erfolg zum Nachweis kleinster Mengen Diphtherieantitoxins benutzt werden. Es lag der Gedanke nahe, die gleiche Methode auch zur Bewertung des Diphtherieserums zu verwenden. Bekanntlich ist Ehrlich bei der subkutanen Prüfung des Diphtherieserums anfangs vom I.O. (= Limes-Glatt)-Wert ausgegangen, hat aber dieses Kriterium zugunsten des L<sub>+</sub>-Wertes aufgegeben, um den Einfluß einer subjektiven Beurteilung des Prüfungseffektes tunlichst zu vermindern. Da wir für die Beurteilung des Erfolges bei der intrakutanen Prüfungsmethode von der Beurteilung des sicht- und fühlbaren Lokaleffektes in der Haut ausgingen, mußten wir uns von vornherein sagen, daß wir damit entschieden wieder mehr mit subjektiven Momenten bei der Bewertung rechnen mußten und somit vielleicht die von uns geplante Vereinfachung der Prüfungsmethode zugleich einen Verzicht auf Exaktheit bedeutete. Inwiefern diese Befürchtung zutreffend ist, wird sich bei der Besprechung unserer Versuchsergebnisse ergeben.

**Versuchstechnik.** Zu unseren Versuchen dienten Meerschweinchen von mittlerem Gewicht, die bisher zu keinen anderen Versuchen verwandt waren und aus gesunder Zucht stammten.

Alle Verdünnungen von Gift und Antitoxin erfolgten mit peinlicher Akkurate; als Verdünnungsflüssigkeit wurde ausschließlich sterile 0,85-proz. Kochsalzlösung benutzt.

Die Präparierung der Tiere erfolgt in der Weise, daß am Abend des der Injektion vorangehenden Tages die seitlichen Brust- und Bauchpartien zunächst mit einer gebogenen Schere kurz geschoren werden. Dann wird mit einem Borsten-

1) Römer, Ueber den Nachweis sehr kleiner Mengen des Diphtheriegiftes. Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 3, Heft 2.

2) Römer und Sames, Zur Bestimmung sehr kleiner Mengen Diphtherieantitoxins. Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 3, Heft 4.

pinsel Calciumhydrosulfid in mäßig dicker Schicht aufgetragen und nach einem Kontakt von 2—3 Minuten mit wassergetränkter Watte energisch abgewaschen, wobei eine glatte Depilierung eintritt. Hierauf wird, um ein Sprödwurden der Haut und die sonst recht häufigen, durch die Depilierung bedingten Ekzeme zu vermeiden, etwas Vaseline auf die depilierten Hautstellen eingerieben. Von den so präparierten Tieren werden am folgenden Tage nur diejenigen zum Versuch verwandt, bei denen keine Hautreizung durch die Depilierung zustande gekommen ist. Es trifft das übrigens bei Beachtung obiger Maßnahmen für nahezu alle Tiere zu.

Die Toxin-Antitoxinmischungen werden in der Weise hergestellt, daß die gewünschte Toxinmenge in 0,05 ccm Flüssigkeit und ebenso die gewünschte Antitoxinmenge in 0,05 ccm Verdünnungsflüssigkeit enthalten ist. Nach Herstellung der Toxin- und Antitoxinverdünnungen werden gleiche Teile derselben (in der Regel je 0,5 oder 1,0 ccm) miteinander in sterilen Gläschen gemischt. Die Mischungen kommen für 2 Stunden in einen auf 37° eingestellten Thermostaten, dann 22 Stunden in den Eisschrank und hierauf wiederum 15 Minuten in den Thermostaten. Dann folgt die Injektion. Indem wir Toxin und Antitoxin so lange in Kontakt ließen, ehe wir die Mischung injizierten, berücksichtigten wir eine Erwägung von Marx<sup>1)</sup>, der an die Möglichkeit eines langsameren Ablaufes der zwischen Toxin und Antitoxin sich abspielenden Reaktion in verdünnter Lösung denkt. Da wir für unsere Prüfungen kleinere Gift- und Antitoxinmengen verwandten, als sie bei der bisher üblichen subkutanen Serumbewertung in Betracht kommen, mußten wir ebenfalls mit einem langsameren Ablauf der in vitro sich abspielenden Reaktion rechnen. In der Tat kann das Ergebnis ein ganz verschiedenes sein, je nachdem wir die Toxin-Antitoxinmischungen kurze Zeit nach dem Zusammenmischen oder erst nach 24-stündigem Kontakt intrakutan injizieren. Ein Beispiel möge das illustrieren (Tabelle I): Meerschweinchen No. 8138 wurde mit Toxin-Antitoxinmischungen intrakutan injiziert, welche 1 Stunde

---

1) Marx, Die Bestimmung kleinster Mengen Diphtherieantitoxins. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 36.



bei 37° gestanden hatten, Meerschweinchen No. 8132 dagegen mit den gleichen Mischungen, nachdem sie 2 Stunden bei 37° und 22 Stunden bei Eisschranktemperatur gestanden hatten. Im letzteren Fall neutralisierte  $\frac{1}{3000}$  ccm vollständig die Gift-dosis von 0,008 ccm, während bei dem erstgenannten Meer-schweinchen die intrakutane Injektion der gleichen Mischung noch von intensivem Lokaleffekt gefolgt war.

Tabelle I.

Meer- schw. No.	Ge- wicht g	0,008 ccm D.G. 1) + ? ccm D.-Serum No. 1	Folgen der Injektion nach				
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	4 × 24 <sup>h</sup>	8 × 24 <sup>h</sup>
8138 (nach 1 Std. injiz.)	280	$\frac{1}{5000}$ l. v.	starke Schwellung und Rötung	beginnende Nekrose	starke Nekrose	derselbe Be- fund	derselbe Befund
		$\frac{1}{4000}$ l. h.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
		$\frac{1}{3000}$ r. v.	geringe Rötung	"	mäßige Nekrose	"	"
		$\frac{1}{2000}$ r. h.	0	0	0	0	0
8132 (nach 24 Std. injiz.)	225	$\frac{1}{5000}$ l. v.	geringe Quaddel	Schwellung und Ver- färbung	Schwellung und Ver- färbung	Schwellung und Ver- färbung	Nekrose
		$\frac{1}{4000}$ l. h.	dgl.	Spur Infiltrat	Spur Nekrose	Spur Nekrose	Spur Nekrose
		$\frac{1}{3000}$ r. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{2000}$ r. h.	0	0	0	0	0

Die injizierte Flüssigkeitsmenge betrug nie mehr oder weniger als 0,1 ccm. Die Injektion wurde ausgeführt mit Hilfe einer mit Zwanzigstel-Einteilung versehenen, 1 ccm fassenden Glasstempelspritze, armiert mit einer tunlichst feinen, aber widerstandsfähigen Kanüle. Die Einspritzung wird so ausgeführt, daß man zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand eine kleine Hautfalte der depilierten Stelle aufhebt, dann die Kanüle in paralleler Richtung zur Oberfläche mög-lichst dicht unter dieselbe einführt. Die ovale Oeffnung der Kanüle hält der Operateur dabei am zweckmäßigsten seinem Auge zugekehrt, um zu erkennen, wenn eben die Kanülen-öffnung unter die Hautoberfläche verschwunden ist; hierauf schiebt man die Kanüle noch 1—2 mm weiter ein, um dann

1) D.G. = Diphtherie-Gift; D.-Serum = Diphtherie-Serum; l. v. = links vorn; l. h. = links hinten; r. v. = rechts vorn; r. h. = rechts hinten.

langsam die Flüssigkeitsmenge von 0,1 ccm zu injizieren. Es entsteht eine erbsengroße Beule, die man nicht durch Streichen oder Massieren verteilt. Beim Herausziehen der Kanüle komprimiert man mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand leicht die Einspritzungsstelle, um das Herausfließen eines Teiles der Flüssigkeit zu verhindern.

Die Kontrolle des Impfeffektes findet nach 24,  $2 \times 24$ ,  $3 \times 24$ ,  $4 \times 24$  und  $8 \times 24$  Stunden statt. Sie besteht einmal in einer genauen Besichtigung der Injektionsstelle, wobei wir besonders darauf aufmerksam machen, daß es zur Erkennung geringer Rötung empfehlenswert ist, aus einer gewissen Entfernung — etwa  $\frac{1}{2}$  m Distanz — die Tiere zu betrachten. Dann folgt Abtastung der Einspritzungsstellen und ihrer Umgebung zur Feststellung vorhandener Schwellungen. Hierbei ist Vergleich mit einer nicht injizierten Hautpartie angezeigt.

Wir haben, wie aus dem Nachfolgenden hervorgehen wird, in der Regel 4 Prüfungen an einem Tier vorgenommen, nachdem wir uns davon überzeugt hatten, daß es keinen wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis hat, ob man je eine Prüfung an einem Tier oder mehrere an demselben ausführt, vorausgesetzt, daß die injizierten Hautstellen nicht zu nahe zusammenliegen und daß die an einer Seite injizierten Gift-dosen nicht zu sehr voneinander differieren.

Wir glaubten, diese detaillierte Schilderung unserer Versuchstechnik vorausschicken zu müssen, da die Befolgung einer stets gleichen Versuchsanordnung Voraussetzung für die Erzielung vergleichbarer Resultate ist.

---

Bei unseren praktischen Versuchen gingen wir aus von der Frankfurter Immunisierungseinheit; Herr Dr. Berghaus hatte wiederholt die Freundlichkeit, uns Frankfurter Standardserum zur Verfügung zu stellen, wofür an dieser Stelle verbindlichst gedankt sei.

Wir stellten gegenüber der Immunisierungseinheit zunächst das für die Versuche gewählte Diphtheriegift Ballon 7 ein, das seit einer Reihe von Jahren im hiesigen Institut in großen Mengen vorrätig gehalten wird. Die direkte Giftprüfung ergab, daß 1 ccm 53000 + M enthielt; 0,0045 ccm repräsentierten also die tödliche Minimaldosis für ein Meerschweinchen von 250 g.

Die entsprechende Prüfungsreihe ist mitgeteilt in einer früheren Arbeit <sup>1)</sup>. Die intrakutan wirksame Minimaldosis entsprach  $\frac{1}{100000}$  ccm. Auch diese Versuchsreihe findet sich in der gleichen Arbeit. Sodann wurde der indirekte Giftwert bestimmt, und zwar einmal bei subkutaner Injektion in Mischung mit 1 IE. und sodann bei intrakutaner Injektion in Mischung mit  $\frac{1}{10}$  IE. Die Ergebnisse sind enthalten in den nachfolgenden Tabellen.

Tabelle II.

## Subkutane indirekte Prüfung des D.G.

Meersch. No.	Gewicht g	1 IE. + ? ccm D.G.	Ergebnis
8118	320	0,08	mäßiges Infiltrat; Nekrose; 5 g Gewichtsverlust
8090	310	0,09	starkes Infiltrat; Nekrose; 5 g Gewichtsverlust
8080	330	0,1	sehr starkes Infiltrat; Nekrose; 5 g Gewichtsverlust
8069	360	0,11	† nach 5 Tagen
8103	320	0,12	† nach $3\frac{1}{2}$ Tagen
8119	370	0,13	† nach 45 Stunden

Die Toxin-Antitoxinmischungen wurden nach  $\frac{1}{2}$ -ständigem Stehen bei 37° subkutan injiziert.

Die L<sub>†</sub>-Dosis des D.G. Ballon 7 entspricht also etwa 0,116 ccm.

Tabelle III.

## Intrakutane indirekte Giftprüfung des D.G. Ballon 7.

Meersch. schw. No.	Ge- wicht g	$\frac{1}{10}$ IE. + ? ccm D.G.	Folgen der Injektion nach				
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	4 × 24 <sup>h</sup>	8 × 24 <sup>h</sup>
A. Versuche an Einzeltieren.							
8090	240	0,001	0	0	0	0	0
8118	260	0,003	0	0	0	0	0
8080	280	0,006	0	0	0	0	0
8069	275	0,008	Spur Schwellung	geringe Schwellung	geringe Schwellung	Spur Nekrose	0
8108	210	0,01	starke Schwellung	beginnende Nekrose	starke Nekrose	starke Nekrose	starke Nekrose
8075	260	0,015	dgl.	Nekrose	dgl.	†	
8100	260	0,02	"	"	†		
8070	260	0,025	"	"	†		

1) Römer, l. c.

Meer- schw. No.	Ge- wicht g	$\frac{1}{10}$ IE. + ? ccm D.G.	Folgen der Injektion nach				
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	4 × 24 <sup>h</sup>	8 × 24 <sup>h</sup>
B. Mehrere Versuche an einem Tier.							
8103	240	0,001 r. h.	0	0	0	0	0
		0,003 r. v.	0	0	0	0	0
		0,006 l. h.	0	0	0	0	0
		0,008 l. v.	Spur Schwellung	geringe Schwellung	geringe Schwellung	0	0
8113	240	0,008 l. v.	Spur Schwellung	Spur Schwellung u. Verfärb.	Spur Schwellung u. Verfärb.	Spürchen Nekrose	0
		0,00825 l. h.	Schwellung u. Rötung	beginnende Nekrose	Nekrose	Nekrose	Narbe
		0,0085 r. v.	dgl.	dgl.	"	"	"
		0,00875 r. h.	"	"	"	starke Nekrose	"
		0,009 l. v.	Verfärb. u. Schwellung	beginnende Nekrose	starke Nekrose	starke Nekrose	starke Nekrose
		0,00925 l. h.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.
8128	240	0,0095 r. v.	"	"	"	"	"
		0,00975 r. h.	"	"	"	"	"
		0,01 l. v.	starke Schwellung u. Rötung	} † nach 26 <sup>h</sup>			
		0,015 l. h.	dgl.				
0,02 r. v.	"						
8076	210	0,025 r. h.	"				

Aus den in Tabelle III mitgeteilten Versuchen ergibt sich, daß diejenige Giftmenge, welche, unter den bezeichneten Bedingungen in Mischung mit  $\frac{1}{10}$  IE. injiziert, eben noch eine Spur lokaler Giftwirkung, eben noch eine Spur Hautnekrose zur Folge hatte, 0,008 ccm beträgt. Wir bezeichnen diese Giftdosis als die Ln(Limes-Nekrose)-Dosis.

Insgesamt führen die bis hierher zitierten Versuche zu folgender Charakterisierung des Diphtheriegiftes Ballon 7:

- A. Direkter Giftwert 1 ccm = 53 000 + M. oder  
 0,0045 „ = tödliche Minimaldosis für ein  
 Meerschweinchen von 250 g  
 0,00001 „ = intrakutane Minimaldosis.  
 B. Indirekter Giftwert 0,116 „ + 1 IE. subkutan = L†  
 0,008 „ +  $\frac{1}{10}$  IE. intrakutan = Ln.

Nach diesen Vorversuchen gingen wir daran, durch die intrakutane Injektionsmethode zwei Diphtheriesera zu prüfen, die uns von befreundeter Seite übergeben waren mit der Angabe, daß das Serum No. 1 voraussichtlich ca. 350-fach, das Serum No. 2 ca. 1350-fach sein würde.

Das Ergebnis enthalten die nachfolgenden Tabellen. Bei der intrakutanen Bewertung des Serums No. 1 suchten wir zunächst in einer Anzahl von Vorversuchen (in Tabelle IV zusammengestellt) uns ungefähre Anhaltspunkte für den voraussichtlichen Antitoxingehalt zu verschaffen, um dann in dem in Tabelle V mitgeteilten endgültigen Versuch das Serum genau einzustellen.

Tabelle IV.  
Intrakutane Prüfung des Serums No. 1 (Vorversuche).

Meersch. schw. No.	Gewicht g	0,008 D.G. + ? ccm D.-Serum No. 1	Folgen der Injektion nach				
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	4 × 24 <sup>h</sup>	8 × 24 <sup>h</sup>
8132	225	1/5000 l. v.	geringe Quaddel	Schwellung u. Verfärb.	Schwellung u. Verfärb.	Schwellung u. Verfärb.	Nekrose
		1/4000 l. v.	dgl.	Spur Infiltrat	Spur Nekrose	Spur Nekrose	Spur Nekrose
		1/3000 r. v.	0	0	0	0	0
		1/2000 r. h.	0	0	0	0	0
8059	360	1/3000 l. v.	kleines Infiltrat	Spur Infiltrat?	0	0	0
		1/2750 l. h.	dgl.	0	0	0	0
		1/2500 r. v.	0	0	0	0	0
		1/2250 r. h.	0	0	0	0	0
8059 <sup>1)</sup>		1/4000 l. v.	starke Schwellung	Nekrose	Nekrose	Nekrose	Narbe
		1/3500 l. h.	dgl.	starke Schwellung	"	"	"
		1/3000 r. v.	"	dgl.	geringe Schwellung	Spur Nekrose	Enthaarung
		1/2500 r. h.	geringes Infiltrat	0	0	0	0

Nach dem Ergebnis der Prüfung an Meerschweinchen 8132 würde der Antitoxingehalt des Serums pro 1 ccm zwischen 300 und 400 IE. liegen. Die erste Prüfung an Meerschweinchen 8059 würde ebenfalls einen Antitoxingehalt von mehr als 300 IE. pro 1 ccm ergeben. Bei der zweiten Prüfung an Meerschweinchen 8059 imponiert das Serum No. 1 nur als etwa 300-fach. Wir halten aber dieses Versuchsergebnis für nicht ganz einwandfrei, da das Tier nach kurzem Zeitintervall an den gleichen Injektionsstellen wieder geprüft wurde. Wir müssen hier mit der Möglichkeit einer lokalen Ueberempfindlichkeit rechnen. Wir möchten überhaupt prinzipiell davon abraten, bei Vornahme von Serumbewertungen ein und dasselbe Tier wiederholt zu verschiedenen Zeiten zu benutzen.

1) Dasselbe Tier 14 Tage später.

Tabelle V.  
Intrakutane Prüfung des Serums No. 1 (endgültiger Versuch).

Meer- schw. No.	Ge- wicht g	0,008 D.G. + ? ccm D.-Serum No. 1	Folgen der Injektion nach				
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	4 × 24 <sup>h</sup>	8 × 24 <sup>h</sup>
8112	280	<sup>1</sup> / <sub>5000</sub> l. v.	Quaddel	beginnende Nekrose	Nekrose	Nekrose	Nekrose
		<sup>1</sup> / <sub>4750</sub> l. h.	„	dgl.	„	„	„
		<sup>1</sup> / <sub>4500</sub> r. v.	geringe Quaddel	deutliche Quaddel	„	„	„
		<sup>1</sup> / <sub>4250</sub> r. h.	dgl.	dgl.	geringe Nekrose	geringe Nekrose	„
8140	250	<sup>1</sup> / <sub>4000</sub> l. v.	Schwellung, etwas Rötung	starke Schwellung, Verfärbung	Spur Nekrose	dgl.	große Ent- haarung
		<sup>1</sup> / <sub>3750</sub> l. h.	dgl.	dgl.	Spürchen Nekrose	Spur Nekrose	Ent- haarung
		<sup>1</sup> / <sub>3500</sub> r. v.	0	Spur Infiltrat	dgl.	Spürchen Nekrose u. Enthaarung	Spur Ent- haarung
		<sup>1</sup> / <sub>3250</sub> r. h.	0	0	0	0	0
8149	220	<sup>1</sup> / <sub>3000</sub> l. v.	0	0	0	0	0
		<sup>1</sup> / <sub>2750</sub> l. h.	0	0	0	0	0
		<sup>1</sup> / <sub>2500</sub> r. v.	0	0	0	0	0
		<sup>1</sup> / <sub>2250</sub> r. h.	0	0	0	0	0

Nach dem Ergebnis dieser Versuchsreihe neutralisierte <sup>1</sup>/<sub>3500</sub> ccm die Giftdosis von 0,008 ccm zu Ln. Es entspricht also (vgl. Tabelle III) <sup>1</sup>/<sub>3500</sub> ccm des Serums No. 1 = <sup>1</sup>/<sub>10</sub> IE.; mithin enthält 1 ccm des Serums No. 1 350 IE.

Wir bewerteten hierauf das Serum No. 1 nach der klassischen subkutanen Mischungsmethode unter Benutzung der (s. Tabelle III) ermittelten L<sub>+</sub>-Dosis des Diphtheriegiftes Ballon 7 = 0,116 ccm. Die Toxin-Antitoxinmischungen wurden in 4 ccm Gesamtflüssigkeit gemischt und nach halbstündigem Stehen bei 37° den in Tabelle VI verzeichneten Meerschweinchen subkutan injiziert.

Tabelle VI.  
Subkutane Prüfung des D.-Serums No. 1.

Meerschw. No.	Gewicht g	0,116 D.G. + ? ccm Serum 1	Ergebnis
8177	260	<sup>1</sup> / <sub>300</sub> ccm	mäßiges Infiltrat
8176	270	<sup>1</sup> / <sub>275</sub> „	starkes Infiltrat
8172	290	<sup>1</sup> / <sub>350</sub> „	+ nach 5 Tagen
8165	280	<sup>1</sup> / <sub>375</sub> „	+ nach 93 Stunden

Es erwies sich nach dem Ausfall der subkutanen Prüfung also das Serum No. 1 als 350—375-fach, d. h. 1 ccm enthielt ca. 360 IE.

Bei der intrakutanen Prüfung (Tabellen IV und V) hatten wir einen Wert von 350 IE. pro 1 ccm ermittelt. Wir finden also eine nahezu vollkommene Uebereinstimmung im Ergebnis beider Prüfungen.

Sodann gingen wir an die intrakutane Bewertung des Diphtherieserums No. 2. Das Ergebnis enthalten die Tabellen VII und VIII. Tabelle VII enthält einige Vorversuche, die dazu dienen sollten, ungefähre Anhaltspunkte für den voraussichtlichen Antitoxingehalt zu verschaffen. Tabelle VIII enthält den endgültigen Versuch.

Tabelle VII.

Intrakutane Prüfung des D.-Serums No. 2 (Vorversuch).

Meersch. No.	Gewicht g	0,008 D.G. + ? ccm D.-Serum No. 2	Folgen der Injektion nach				
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	4 × 24 <sup>h</sup>	8 × 24 <sup>h</sup>
8139	290	$\frac{1}{15000}$ l. v.	Rötung und Schwellung	starke Schwellung	geringe Nekrose	Nekrose	Nekrose
		$\frac{1}{12000}$ l. h.	Spur Schwellung	0	0	0	0
		$\frac{1}{10000}$ r. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{9000}$ r. h.	0	0	0	0	0
8060	370	$\frac{1}{18000}$ l. v.	geringe Infiltration	geringes Infiltrat	geringes Infiltrat	0	0
		$\frac{1}{12000}$ l. h.	geringe Schwellung	0	0	0	0
		$\frac{1}{11000}$ r. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{10000}$ r. h.	0	0	0	0	0
8104	270	$\frac{1}{11500}$ l. v.	Spur Rötung	0	0	0	0
		$\frac{1}{12000}$ l. h.	dgl.	Spur Infiltrat	0	0	0
		$\frac{1}{12500}$ r. v.	„	dgl.	0	0	0
		$\frac{1}{13000}$ r. h.	Schwellung	Schwellung	Spur Infiltrat	Spur Infiltrat	Spur Ent- haarung

Nach dem Ergebnis der Vorprüfung an Meerschweinchen 8139 liegt der Wert des Serums No. 2 zwischen 1500 und 1200 IE. pro 1 ccm. Das bestätigen auch die weiteren Vorprüfungen an Meerschweinchen 8060 und 8104. In beiden Fällen neutralisiert  $\frac{1}{1300}$  ccm die Giftdosis von 0,008 ccm so weit, daß es noch nicht zu einer deutlichen Nekrose kommt.

Tabelle VIII enthält die Versuche zur endgültigen Einstellung des Serums No. 2.

Tabelle VIII.

Intrakutane Prüfung des D.-Serums No. 2 (endgültiger Versuch).

Meer- schw. No.	Ge- wicht g	0,008 D.G. + ? ccm D.-Serum No. 2	Folgen der Injektion nach				
			24 <sup>h</sup>	2 × 24 <sup>h</sup>	3 × 24 <sup>h</sup>	4 × 24 <sup>h</sup>	8 × 24 <sup>h</sup>
8149	270	$\frac{1}{15000}$ l. v.	Schwel- lung und Rötung dgl.	Schwel- lung und Rötung dgl.	Infiltrat	geringe Nekrose	Nekrose
		$\frac{1}{14500}$ l. h.			„	dgl.	Ent- haarung
		$\frac{1}{14000}$ r. v.	geringe Rötung dgl.	geringe Rötung dgl.	„	Spur Nekrose	Spur Ent- haarung
		$\frac{1}{13500}$ r. h.			„	Andeu- tung von Nekrose	0
8148	270	$\frac{1}{13000}$ l. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{12500}$ l. h.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{12000}$ r. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{11500}$ r. h.	0	0	0	0	0
8146	250	$\frac{1}{11000}$ l. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{10500}$ l. h.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{10000}$ r. v.	0	0	0	0	0
		$\frac{1}{9500}$ r. h.	0	0	0	0	0

Nach dem Ergebnis dieser Prüfung entsprechen Dosen von  $\frac{1}{13500}$ — $\frac{1}{14000}$  ccm des Serums No. 2  $\hat{=}$   $\frac{1}{10}$  IE.; mithin enthielt 1 ccm des Serums No. 2 ca. 1350—1400 IE.

Wir bewerteten hierauf das Serum No. 2 nach der klassischen subkutanen Methode, und zwar genau in der gleichen Weise wie oben das Serum No. 1 (vergl. Tabelle VI).

Tabelle IX.

Subkutane Prüfung des D.-Serums No. 2.

Meer- schweinchen No.	Gewicht g	0,116 ccm D.G. + ? ccm D.-Serum No. 2	Ergebnis
8169	290	$\frac{1}{1250}$	geringes Infiltrat
8179	290	$\frac{1}{1300}$	mäßiges
8180	350	$\frac{1}{1350}$	+ nach 4 $\frac{1}{2}$ Tagen
8193	280	$\frac{1}{1400}$	+ „ 4 $\frac{1}{2}$ „
8170	280	$\frac{1}{1450}$	+ „ 3 „



Es erwies sich also nach dem Ausfall der subkutanen Prüfung das Serum No. 2 als 1350—1400-fach, d. h. 1 ccm enthält 1350—1400 IE.

Bei der intrakutanen Prüfung (Tabellen VII und VIII) hatten wir ebenfalls einen Wert von 1350—1400 IE. pro 1 ccm ermittelt. Wir finden also eine völlige Uebereinstimmung im Ergebnis beider Prüfungen.

Insgesamt geht aus unseren Versuchen hervor, daß eine nahezu völlige Uebereinstimmung in dem Ergebnis der intrakutanen Bewertungsmethode einerseits und der klassischen subkutanen Methode anderseits unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen besteht. Die intrakutane Bewertungsmethode hat den unzweifelhaften Nachteil, daß sie einer subjektiven Beurteilung mehr Spielraum läßt. Auf Grund unserer Erfahrungen glauben wir aber, daß bei einiger Uebung in der Beurteilung der Resultate dieses subjektive Moment kaum zu sachlichen Irrtümern Veranlassung geben wird. Demgegenüber steht der große Vorteil, daß man nicht ein einziges Tier bei einer derartigen Prüfung zu verlieren braucht, was für Institute, die mit beschränkten Mitteln rechnen müssen, von Bedeutung ist. Die Möglichkeit, Diphtherieversuche in größerem Stil anzustellen, war ja bis heute nahezu ausschließlich ein Vorrecht der reicher dotierten Institute. Weiter besteht für die intrakutane Prüfungsmethode der große Vorzug, daß man an einem Tier mehrere Prüfungen ausführen und somit schon an einer beschränkten Tierzahl Bewertungen von großer Präzision bewerkstelligen kann. Wir zweifeln nicht daran, daß es bei der bekannten Exaktheit unserer amtlichen Prüfungsstelle gelingen würde, zu einem intrakutanen Prüfungsschema zu kommen, das die gleiche Exaktheit der Prüfung garantiert wie das bisherige Verfahren. Ob hierzu ein Bedürfnis für die amtliche Prüfung vorliegt, können wir nicht entscheiden. Für die weitere tierexperimentelle Erforschung der Beziehungen von Diphtherietoxin und Antitoxin wird die von uns beschriebene Vereinfachung der Antitoxinbewertung aber sicherlich willkommen sein.

Das Prinzip unseres Prüfungsverfahrens scheint uns aber vor allem aussichtsreich zur Bewertung mancher als schutz-

und heilkräftig erkannter Sera, bei denen es mit einer wirklich zuverlässigen Prüfungsmethode noch hapert. Wir denken hier vor allem an das Dysenterieserum, das Milzbrandserum, das Streptokokkenserum, das Meningokokkenserum, das Pneumokokkenserum u. a. Bei einigen unter diesen haben Vorversuche bereits recht hoffnungsvolle Ergebnisse gehabt. Da man durch intrakutane Injektion, wie wir am Beispiel des Diphtheriegiftes gesehen haben, in der Lage ist, sich eventuell minimale Mengen von Gift noch erkennbar zu machen, hoffen wir auch, die bei den bisherigen Methoden tierexperimenteller Serumprüfung vielleicht verdeckten antitoxischen Quoten solcher Schutz- und Heilsera mit nicht sichergestelltem Wirkungsmechanismus uns gewissermaßen ad oculos zu demonstrieren.

Noch auf ein Ergebnis theoretischer Art sei kurz hingewiesen. In der früheren Arbeit haben Römer und Sames für das auch von uns benutzte Diphtheriegift Ballon 7 mit Hilfe des Frankfurter Testserums folgende Neutralisierungsformel bei intrakutaner Prüfung festgestellt:

$$0,00001 \text{ ccm D.G.} + \frac{1}{40000} \text{ IE.} = \text{Ln.}$$

$$0,0002 \quad \text{,,} \quad \text{,,} + \frac{1}{2000} \quad \text{,,} = \quad \text{,,}$$

Es erfolgte also die Neutralisierung unter den gewählten Bedingungen genau nach dem Gesetz der multiplen Proportionen. Das trifft aber offenbar nicht für jedes Verhältnis von Gift und Antitoxin zu; denn wir fanden bei intrakutaner Prüfung der Giftdosis von 0,008 ccm die Formel:

$$0,008 \text{ ccm D.G.} + \frac{1}{10} \text{ IE.} = \text{Ln.}$$

Erfolgte auch bei dieser Konzentration die Neutralisierung nach den gleichen Proportionen, so hätten wir auf Grund der Berechnung erwarten müssen, daß bereits  $\frac{1}{50}$  IE. ausgereicht hätte, um die Dosis von 0,008 ccm zu Ln. zu neutralisieren. Tatsächlich aber war  $\frac{1}{10}$  IE. erforderlich. Es erfordern demnach unter bestimmten Bedingungen größere Diphtheriegift-dosen nicht nur absolut, sondern auch relativ größere Antitoxindosen. Es ist dieses Ergebnis um so bemerkenswerter, als für die Neutralisierung des Tetanusgiftes durch Antitoxin genau das Umgekehrte gilt. Je kleiner die Tetanusgift-dosis, um so relativ größere Antitoxinmengen sind zu ihrer Neutralisierung erforderlich. Auf diesen Gegensatz zwischen Di-

phtherie- und Tetanusgift hat v. Behring bereits früher wiederholt<sup>1)</sup> aufmerksam gemacht.

Wir weisen endlich darauf hin, daß wir von der deutlichen Giftwirkung, die das Diphtheriegift bei intrakutaner Injektion entfaltet, Gebrauch gemacht haben, um zur Entscheidung der zurzeit gerade so heftig (zwischen Berghaus und Kraus)<sup>2)</sup> diskutierten Frage beizutragen, ob der durch die übliche Mischungsmethode ermittelte Antitoxinwert dem Heilwert eines Diphtherieserums stets parallel geht. Bei der Langwierigkeit solcher Versuche wird sich die Feststellung endgültiger Ergebnisse wohl noch etwas verzögern.

### Zusammenfassung.

1) Durch intrakutane Injektion von Diphtherietoxin-Antitoxinmischungen gelingt es mit Hilfe des in dieser Arbeit beschriebenen Prüfungsmodus, Diphtheriesera mit unbekanntem Antitoxingehalt so zu bewerten, daß die Genauigkeit des Prüfungsergebnisses an die der üblichen subkutanen Methode zum mindesten nahe herankommt.

2) Die intrakutane Prüfungsmethode ergibt eine Bestätigung des durch v. Behring schon früher aufgestellten Satzes, daß der Antitoxinbedarf zur Neutralisierung des Diphtheriegiftes mit zunehmender Verdünnung des Giftes nicht nur absolut, sondern auch relativ geringer wird.

3) Die intrakutane Injektionsmethode von Gift und Antitoxin verspricht auf Grund einiger Vorversuche Erfolge auch für die Auswertung bisher schwer bewertbarer Sera.

---

1) v. Behring, Experimentelle Begründung der antitoxischen Diphtherietherapie. Deutsche Klinik, Bd. 1, 1901. — Derselbe, Aetiologie und ätiologische Therapie des Tetanus. Beiträge zur experimentellen Therapie, Heft 7, 1904.

2) Vergl. u. a. Kraus und Schwoner, Ueber Beziehungen des Antitoxingehaltes des Diphtherieserums zu dessen Heilwert. Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 2, Heft 6.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der biologischen Abteilung (Prof. v. Dungern) des Instituts für Krebsforschung (Exz. Czerny) in Heidelberg.]

### **Ueber Autospermotoxine.**

Von **Heinrich Adler.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 9. August 1909.)

Während mit fremden cellulären Elementen nach dem Vorgange von Bordet, v. Dungern, Landsteiner etc. sehr zahlreiche Untersuchungen über Antikörperbildung angestellt wurden, sind mit Zellen der gleichen Tierart nur wenige Beobachtungen erhoben. Ehrlich und Morgenroth erhielten Isohämolysine bei Ziegen, denen sie das lackfarbige Ziegenblut injiziert hatten. Diese wirkten jedoch niemals auf das Blut des vorbehandelten Tieres selbst. Metalnikoff<sup>1)</sup> hat bei Meerschweinchen mit arteigenem Hoden komplexe Antikörper hervorrufen können, welche Meerschweinchenspermatozoen in kurzer Zeit abtöteten; er konnte auch den wichtigen Befund erheben, daß die so erhaltenen Immunsere in vitro bzw. in der Peritonealhöhle die dem gleichen Tier entnommenen Spermatozoen ebenso abtöteten. Im Nebenhoden werden die Spermatozoen auffallenderweise von den Spermotoxinen des Blutes nicht angegriffen, obwohl sie dem Serum in kürzester Zeit erliegen. Nach Metalnikoff erklärt sich diese Tatsache dadurch, daß die Spermatozoen des Immuntieres mit dem Alexin (Komplement) des Blutes in vivo nicht in Zusammenhang treten, da dieses nach der Anschauung von Metschnikoff nicht im Plasma vorhanden ist, sondern erst bei der Blutgerinnung aus Leukocyten in das Serum eintreten soll. Er nimmt dagegen an, daß die Spermatozoen schon während des Lebens den Immunkörper binden, da die Spermatozoen des vorbehandelten Tieres bei seinen Versuchen in normalem Meerschweinchenserum etwas leichter zugrunde gingen als die normaler Meerschweinchen.

Da die Entstehung der Immunität bei autochthonen Geschwülsten die Voraussetzung hat, daß die individuum-eigenen

1) Annales Pasteur, 1900.

Zellen Antikörperreaktionen auslösen können, so habe ich auf Anregung von Herrn Prof. v. Dungern diese Versuche wieder aufgenommen. Während Metalnikoff die Spermotoxine, wenn auch mit arteigenem, aber doch von fremden Individuen stammendem Hoden hervorgerufen und dann die Wirksamkeit der entstandenen Immunkörper auf das eigene Gewebe festgestellt hat, war es gerade in Rücksicht auf das Problem der Geschwulstimmunität von Interesse, festzustellen, ob auch das demselben Individuum entnommene Gewebe, parenteral eingeführt, Antikörper hervorrufen kann.

Ich habe zwei Reihen von Versuchen mit Meerschweinchen angestellt. Eine Reihe von Meerschweinchen wurde einseitig kastriert; die Hälfte des entnommenen Hodens wurde dann im Mörser fein zerrieben und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt jedesmal demselben Meerschweinchen intraperitoneal eingeführt. Am 5. Tage nach der ersten Einspritzung wurde dasselbe Verfahren mit der zweiten Hälfte des Hodens wiederholt. In der zweiten Reihe habe ich die Meerschweinchen mit zweimaligen Injektionen von nur arteigenem, aber nicht individuumeigenem Hodengewebe behandelt. Am 10. oder 11. Tage entblutete ich die Tiere und untersuchte ihre Sera auf den Gehalt an Iso- und Autospermotoxin. Die Versuchsanordnung wird durch die folgende Tabelle veranschaulicht:

Tier A vorbehandelt mit eigenem Hoden	Tier B vorbehandelt mit arteigenem Hoden	Tier C nicht vor- behandelt
Spermatozoen A in		
Serum A Tod nach 2 Minuten	Serum B Tod nach 2 Minuten	Serum C Ueberleben
Spermatozoen B in		
Serum A Tod nach 3 Minuten	Serum B Tod nach 7 Minuten	Serum C Ueberleben
Spermatozoen C in		
Serum A Tod nach 3 Minuten	Serum B Tod nach 5 Minuten	Serum C Ueberleben

Die zahlreichen Versuche, die ich in dieser Weise vornahm, führten ausnahmslos zu dem gleichen Ergebnis. Alle Spermatozoen wurden in dem Serum vorbehandelter Tiere schon nach wenigen (von 2—7) Minuten bewegungslos, während sie in dem Serum normaler Tiere sehr lange (mindestens  $\frac{1}{2}$  Stunde) eine lebhafte Bewegung zeigten.

In einem Falle war das Serum eines nicht vorbehandelten Meerschweinchens jedoch stärker wirksam; es tötete nämlich die Spermatozoen in 15 Minuten ab. Obwohl dieser Umstand nicht als erhebliche Fehlerquelle in Betracht kam, so habe ich doch, um von individuellen Verschiedenheiten der Sera vollkommen unabhängig zu sein, in einer weiteren Versuchsreihe die zur Kontrolle dienenden Normalsera denselben Tieren entnommen, denen nachher die Hodensubstanz injiziert wurde. Die Sera wurden aus der Art. carotis gewonnen und in eingefrorenem Zustande zur Kontrolle aufbewahrt, nachdem sie schon sofort nach der Entnahme auf ihre Wirkung auf die Spermatozoen des gleichen Tieres geprüft waren. Die Resultate waren genau dieselben.

Es ist also festgestellt, daß das einem Meerschweinchen entnommene Hodengewebe bei demselben Tier nach intraperitonealer Einführung Antikörper hervorruft, welche in vitro mit den Spermatozoen desselben Tieres reagieren.

Es war nun die Frage zu beantworten, warum die Spermatozoen, die in vitro dem Serum in kürzester Zeit erliegen, nicht auch in vivo abgetötet werden. Metalnikoff nimmt an, daß die Spermatozoen des Immuntieres mit „Sensibilisin“ beladen seien und lediglich dem supponierten „Alexin“-Mangel des Blutplasmas ihre Lebensfähigkeit verdanken. In diesem Punkte kann ich seine Beobachtungen nicht bestätigen: die dem Immuntier entnommenen Spermatozoen bleiben nach Zusatz eines frischen komplementhaltigen Serums genau ebenso lange wie die Spermatozoen eines nicht behandelten Tieres am Leben. Es ist daraus zu schließen, daß die Spermatozoen in vivo mit dem spermotoxischen Antikörper nicht in Berührung kommen.

Ich habe daher weiter untersucht, ob eine spermotoxische Wirkung auch dann zu konstatieren ist, wenn man an Stelle

des Immunserums das mit Natrium citricum gewonnene Plasma verwendet. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Plasma und Serum. Man muß daher annehmen, daß das Spermotoxin in Blutplasma zirkuliert und trotzdem von den in dem Nebenhoden sich befindenden Spermatozoen nicht gebunden werden kann. Ob das intakte Gefäßendothel für das Spermotoxin undurchlässig ist, oder ob hier andere Faktoren mitspielen, welche die Zellen in vivo zu schützen vermögen, darüber geben meine Experimente keinen Aufschluß.

Ich habe nun weiter geprüft, ob diese Autospermotoxine organspezifisch sind. Eine Wirkung auf Blut der gleichen Tierart habe ich [ebensowenig wie London<sup>1)</sup>] niemals beobachtet. Auch mit Leber- und Niereninjektionen ließen sich keine Spermotoxine hervorrufen. Die Organspezifität ist demnach viel ausgeprägter, als wenn Hodengewebe einer fremden Tierart benutzt wird.

Die Spermotoxine scheinen nicht streng artspezifisch zu sein. Die Kaninchenspermatozoen werden deutlich agglutiniert und nach ca. 20 Minuten abgetötet, während das Normalserum erst nach ca. 40–60 Minuten dieselbe Wirkung entfaltet.

#### Zusammenfassung.

1) Das Hodengewebe von einem Meerschweinchen, operativ entfernt und ihm in zerriebenem Zustande intraperitoneal eingeführt, ruft eine Bildung von Spermotoxin hervor, welches auf die Spermatozoen des gleichen Tieres und auch auf diejenigen anderer Meerschweinchen wirkt.

2) Die Spermatozoen der immunisierten Tiere sind nicht sensibilisiert.

3) Die iso- und autospermotoxischen Sera sind nicht hämolytisch.

4) Die Spermotoxine sind durch Injektion von artgleichem Leber- oder Nierengewebe nicht zu erzeugen.

5) Die Spermotoxine sind nicht streng artspezifisch.

---

1) Centralbl. f. Bakt., 1902.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Instituts für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. (Direktor: Geh. Obermed.-Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

**Ueber den Einfluß der Osmiumsäure auf das Ambozeptorbindungsvermögen der roten Blutzellen.**

Von Dr. Aurel von Szily,

Assistent an der Universitätsaugenklinik in Freiburg i. B.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. August 1909.)

Durch die in der Seitenkettentheorie zum Ausdruck gebrachte Konzeption einer spezifischen Bindung der Antigene im Organismus als Ursache der Antikörperbildung wurde das Wesen der spezifischen Beziehungen, welche zwischen Antigenen und Antikörpern bestehen, zum ersten Male dem Verständnis zugänglich. Die Annahme einer Identität der die Antikörper bindenden und sie auslösenden Rezeptoren erwies sich überaus klärend und hat durch die seit v. Dungern vielfältig bestätigte Feststellung, daß die Besetzung der Rezeptoren durch die entsprechenden Antikörper auch die Fähigkeit zur Antikörperbildung zunichte macht, eine beweiskräftige experimentelle Stütze erfahren. Erscheint es in der Tat heute kaum mehr verständlich, daß bei dem spezifischen Charakter der Immunitätsreaktionen ein intimer Zusammenhang zwischen den für die Antikörperbindung verantwortlichen und den für ihre Erzeugung maßgebenden Komponenten fehlen sollte, so müssen Versuche, welche eine vollständige Unabhängigkeit beider Faktoren erweisen sollten, um so mehr zu kritischer Betrachtung auffordern.

So konnten bereits die interessanten Untersuchungen von Friedberger und Moreschi<sup>1)</sup>, welche mit gewissen Typhusstämmen Bildung von Antikörpern erzielen konnten, ohne daß letztere von den gleichen Stämmen nachweislich gebunden wurden, durch die Heranziehung des Aviditäts-

---

1) E. Friedberger und C. Moreschi, Ueber Rassendifferenzen von Typhusstämmen. Berl. klin. Wochenschr., 1905, No. 45.



faktors hinreichend erklärt werden, ohne mit den Autoren im Sinne einer Differenzierung von Antikörper bildenden und bindenden Gruppen gedeutet werden zu müssen [vergl. hierzu: Meinicke, Jaffé und Flemming<sup>1)</sup>]. Insbesondere haben aber die Untersuchungen von Bang und Forssmann<sup>2)</sup>, die für die roten Blutkörperchen eine Differenzierung der ambozeptorbindenden Substanz von dem die Antikörperbildung bewirkenden Bestandteil erwiesen zu haben glaubten, breite Angriffsflächen dargeboten, die bereits durch Sachs<sup>3)</sup> und von Liebermann<sup>4)</sup> hinreichend charakterisiert worden sind. In der Tat entbehren diejenigen Versuche der Autoren, welche bei gewissen Alterationen der roten Blutzellen einen Mangel an Ambozeptorbindung bei noch vorhandener Fähigkeit der Auslösung von Antikörpern demonstrieren sollen, der Beweiskraft in dem gewollten Sinne. Denn einmal kann sich die immunisierende Funktion als die feinere Reaktion dokumentieren, dabei aber das Ambozeptorbindungsvermögen, obwohl vorhanden, dem Nachweise entgehen; dann steht aber auch ein wichtiges Glied der von Bang und Forssmann erhobenen Befunde — die Angabe des Mangels an Ambozeptorbindungsvermögen bei erhitzten Stromata — mit früheren Untersuchungen von Muir und Ferguson<sup>5)</sup> in direktem Widerspruch. Forssmann (l.c.) hat daher versucht, Beweise für eine Differenzierung von ambozeptorbindender und antigener Substanz der roten Blutkörperchen auf andere Weise zu erlangen. Er schloß Blut-

1) E. Meinicke, J. Jaffé und J. Flemming, Ueber die Bindungsverhältnisse der Choleravibrionen. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 52, 1906.

2) J. Bang und J. Forssmann, Untersuchungen über die Hämolysinbildung. Beitr. zur chem. Phys. u. Path., Bd. 8, 1906, p. 238. — J. Forssmann, Sind das Antigen und die ambozeptorfixierende Substanz der Blutkörperchen identisch oder verschieden? Biochem. Zeitschr., Bd. 9, 1908, p. 330; cf. auch ebenda, Bd. 15, 1908, p. 19.

3) H. Sachs, in: Lubarsch-Ostertags Ergebnissen der allgemeinen Pathol., Bd. 11, 1907, p. 515, und in Kraus-Levaditis Handbuch der Immunitätsforschung, Bd. 1, 1907, p. 244, und Bd. 2, 1909, p. 895.

4) L. v. Liebermann, Können Antigene Ambozeptoren binden? Biochem. Zeitschr., Bd. 11, 1908, p. 405.

5) R. Muir and A. R. Ferguson, On the hemolytic receptors of the red corpuscles. Journ. of Path. and Bact., 1906, p. 84.

körperchenstromata in Kollodiumkapseln in die Bauchhöhle von Tieren ein und erhielt in einigen Fällen einen Rückstand, der noch eine Ambozeptorbindung bewirkte, aber nicht mehr befähigt war, die Bildung von Ambozeptoren im Tierkörper anzuregen.

Nun ist auch eine derartige Modifikation von Antigenen sehr wohl denkbar, ohne daß sie zu einer Schlußfolgerung auf die Verschiedenheit von ambozeptorbindender und ambozeptorauslösender Substanz berechtigt. Die in der Seitenkettentheorie zum Ausdruck gebrachte Vorstellung von einer einheitlichen haptophoren Gruppe trägt ja nur dem spezifischen Charakter des Vorganges Rechnung. Sie postuliert als primäre Ursache des Prozesses, welcher zur Antikörperbildung führt, die spezifische Bindung des Antigens mittels der Antikörper bindenden Gruppe. Dabei ist es durchaus denkbar, daß zur Einleitung des Sekretionsstadiums noch ein weiteres Moment erforderlich ist, das bereits Ehrlich und Morgenroth<sup>1)</sup> vermuteten, indem sie von einem „ictus immunisatorius“ als von einem besonderen, das oft außerordentliche Maß des Neubildungsvorganges erklärenden Zellreize sprachen. Zu der Annahme einer bestimmten Reizwirkung sind auch Pfeiffer<sup>2)</sup> und Wassermann<sup>3)</sup> gelangt, und Wassermann gab diesem unbekannten Moment in dem Ausdruck „Bindungsreiz“ einen Namen. Er konnte sich dabei auf experimentelle Ergebnisse Brucks<sup>4)</sup> stützen, aus denen hervorging, daß eine vollkommen atoxisch gewordene Tetanusgiftlösung sich zur Antikörpererzeugung nicht mehr eignete, obwohl das Vorhandensein antitoxinbindender Gruppen nachgewiesen werden konnte. Diese Untersuchungen Brucks

1) P. Ehrlich und J. Morgenroth, Ueber Hämolyse. III. Mitteilung. Berl. klin. Wochenschr., 1900, No. 21. Cf. auch in: Emmerich-Fröhlich's Anleitungen zu hygien. Untersuchungen, 3. Aufl., München 1902.

2) R. Pfeiffer, Referat auf dem XIII. internat. Kongreß f. Hygiene, Brüssel 1903.

3) A. Wassermann, ebenda, und in: Kolle-Wassermanns Handbuch d. pathogenen Mikroorganismen, Bd. 4, 1909; cf. hierzu auch: v. Dungern, Die Antikörper, 1903.

4) C. Bruck, Experimentelle Beiträge zur Theorie der Immunität. Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 46, 1903, p. 176.

stellen bereits ein vollkommenes Analogon zu den erwähnten Befunden Forssmanns dar, und es ist um so verwunderlicher, daß der letztere Autor in seinen Schlußfolgerungen über die von Bruck gezogene Konsequenz, daß die Besetzung der Rezeptoren zur Antikörperbildung nicht immer zu genügen scheint, so weit hinausgeht. In der Tat dürften dieselben, wie dies bereits in den Darlegungen von Liebermanns und Sachs' auseinandergesetzt wurde, der Begründung entbehren. Die einzige Schlußfolgerung, die berechtigt erscheinen könnte, wäre in Uebereinstimmung mit Bruck dahin zu formulieren, daß die bindende Fähigkeit der Blutkörperchen-Antigene nicht immer zur Antikörperbildung ausreicht. Aber selbst dieser Schluß steht auf recht unsicherer Basis. Abgesehen von zahlreichen Bedenken, die sich aus der schwierigen Kontrolle der ungewöhnlichen Versuchsanordnung Forssmanns ergeben, drängt sich die in ähnlicher Weise auch durch v. Liebermann geäußerte Vermutung auf, daß die antihämolytische Wirkung der wohl sicherlich stark alterierten Kapselrückstände gar nicht durch echte Rezeptorbindung, sondern durch unspezifische Einflüsse bedingt sein könnte, zumal irgendwelche Kautelen, welche diesem Einwand entgegenstehen, nicht ersichtlich sind.

Hätte die Wiederholung des von Forssmann beschrittenen diffizilen Weges wegen der recht mangelhaften Durchsichtigkeit des Vorgehens und der Unsicherheit des Gelingens nicht unerheblichen Schwierigkeiten begegnen müssen, so weisen Untersuchungen, über die vor kurzer Zeit von Coca<sup>1)</sup> berichtet wurde, und welche zu einem den von Forssmann erhobenen Befunden durchaus entsprechenden Tatbestand führten, eine einfache und leicht reproduzierbare Anordnung auf. Coca stellte nämlich fest, daß stark osmierte Rinderblutkörperchen noch bindungsfähig für hämolytische Ambozeptoren sind, dagegen nicht mehr Antikörper auszulösen vermögen. Obwohl Coca also zu Ergebnissen gelangte, welche den Forssmannschen analog sind, ist er doch weit entfernt, den Deduktionen des letzteren Autors zu

---

1) A. F. Coca, Beitrag zur Antikörperentstehung. Biochem. Zeitschr., Bd. 14, 1908, p. 125.

folgen. Er schließt vielmehr lediglich, daß „die Fähigkeit der protoplasmatischen Substanzen, spezifisch gewonnene Antikörper zu binden, nicht immer ausreicht, um ihnen die Eigenschaften der Antigene zu verleihen“. Trotzdem schien eine erweiterte Nachprüfung geboten, da ähnliche Bedenken, wie sie oben gegenüber den Versuchen Forssmanns geäußert wurden, sich auch bei der Betrachtung der Untersuchungen Cocas geltend machen konnten, wenn auch einige angeführte Kontrollen nicht im Sinne ihrer Stichhaltigkeit sprachen.

Bei der Ausführung der Versuche hielt ich mich zunächst streng an die Angaben Cocas und nahm die Behandlung des Blutes mit Osmiumsäure nach seinen Vorschriften folgendermaßen vor:

5 ccm serumfrei gewaschenes Rinderblut wurden mit 13,5 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung und 4 ccm einer 2-proz. Lösung von Osmiumsäure (Merck)  $\frac{1}{2}$  Stunde lang bei Zimmertemperatur digeriert. Sodann wurden die „osmierten“ Blutkörperchen abzentrifugiert, das Sediment wurde 4mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zum Schluß wieder auf ein Volumen von 5 ccm gebracht. Zu den Bindungsversuchen dienten 5-proz. Verdünnungen des derart „osmierten“ Blutes.

Als hämolytisches System wurde das inaktivierte Serum von mit Rinderblut vorbehandelten Kaninchen als Ambozeptor, Meerschweinchenserum als Komplement benutzt. Die Notierung der eingetretenen Hämolyse erfolgte nach 2-stündigem Stehen bei 37° und etwa 18–20-stündigem Aufenthalt im Eisschrank.

Zur Feststellung der Bindungskapazität des normalen und osmierten Rinderblutes wurde in folgender Weise vorgegangen:

Absteigende Mengen des inaktiven Immunserums wurden mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1 ccm aufgefüllt und mit je 1 ccm

A. 5-proz. normalen Rinderblutes,

B. 5-proz. osmierten Rinderblutes

1 Stunde bei 37° digeriert. Sodann wurden die Röhrchen zentrifugiert und die klaren Flüssigkeiten auf die Sedimente von je 1 ccm 5-proz. Rinderblutes abgegossen, denen noch je 0,15 ccm zu gleichen Teilen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Meerschweinchenserums als Komplement zugefügt wurden. In einer Kontrollreihe (C) wurde je 1 ccm 5-proz. Rinderblut mit entsprechenden Mengen des Immunserums und Meerschweinchenserums digeriert. Die eingetretene Hämolyse zeigt Tabelle I.

Tabelle I.

Mengen des Immun- serums  ccm	Hämolyse von Rinderblut (0,05 ccm) durch Vermittelung von 0,075 ccm Meerschweinchenserum und Immunserum, das zur Verwendung kam:		
	A. nach Digerieren mit normalem Rinderblut	B. nach Digerieren mit osmiertem Rinderblut	C. nativ
0,025	komplett	komplett	komplett
0,015	"	"	"
0,01	mäßig	"	"
0,005	Spur	wenig	"
0,0025	Spürchen	Spur	"
0,0015	0	Spürchen	"
0,001	0	0	fast komplett
0,0005	0	0	wenig
0,00025	0	0	Spürchen
0,00015	0	0	0

Wenn sich aus der Tabelle auch ergibt, daß die osmierten Blutzellen an Bindungsfähigkeit etwas eingebüßt haben, so zeigt sie doch in Uebereinstimmung mit den Angaben Cocas, daß trotz der Behandlung mit Osmiumsäure ein beträchtliches Ambozeptorbindungsvermögen vorhanden ist. Wenn ich noch hinzufüge, daß das gleiche osmierte Blut sich zur Hämolysinerzeugung unfähig erwies, so ergibt sich scheinbar eine vollständige Bestätigung der von Coca mitgeteilten Ergebnisse.

Die wichtigste Frage war aber, ob es sich bei der Absorption des Ambozeptors durch das osmierte Blut um denselben Vorgang handelte, durch den das native Blut ambozeptorbindend wirkt. Wenn auch von Coca angegeben wurde, daß osmiertes Kaninchenblut die für Rinderblut spezifischen Ambozeptoren nicht zu binden geeignet ist, so konnte man doch daran denken, daß verschiedene Blutarten durch die Osmiumsäure nicht in gleicher Weise alteriert werden, und daß möglicherweise auch geringe Variationen technischer Art und individueller Blutbeschaffenheit Verschiedenheiten der Osmiumsäurewirkung bedingen könnten. Um eine klarere Uebersicht zu gewinnen, hätten daher Versuche über das Verhalten des osmierten Rinderblutes gegenüber nicht-spezifischen Ambozeptoren aussichtsvoll erscheinen müssen. Jedoch übrierte sich ein Vorgehen in dieser Richtung, da ich un-

erwarteterweise feststellen konnte, daß osmiertes Meerschweinchenblut die Immunambozeptoren für Rinderblut in gleichem, oft noch höherem Maße absorbiert, als die homologe Blutart. Ich lasse ein Versuchsbeispiel folgen, das einen Parallelversuch zu dem in Tabelle I notierten darstellt.

Die Osmiumsäurebehandlung des Meerschweinchenblutes erfolgte in genau der gleichen Weise, wie sie oben für Rinderblut geschildert wurde. Die übrigen Materialien und Prozeduren waren mutatis mutandis dieselben, so daß von einer detaillierten Beschreibung abgesehen werden kann. Das Ergebnis ist in Tabelle II notiert.

Tabelle II.

Mengen des Immun- serums  ccm	Hämolyse von Rinderblut (0,05 ccm) durch Vermittlung von 0,075 ccm Meerschweinchenserum und Rinderblutimmun- serum; letzteres:		
	A. nach Digerieren mit normalem Meerschweinchenblut	B. nach Digerieren mit osmiertem Meerschweinchenblut	C. nativ
0,025	komplett	}	komplett
0,015	"		"
0,01	"		"
0,005	"		"
0,0025	"		"
0,0015	"		"
0,001	fast komplett		fast "
0,0005	wenig		komplett
0,00025	Spur		wenig
0,00015	Spürchen		Spur
0,0001	0		Spürchen
			0

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß osmiertes Meerschweinchenblut die Rinderblutambozeptoren in außerordentlich hohem Grade absorbiert, während normales Meerschweinchenblut dieselben vollständig intakt läßt. Das Absorptionsvermögen war nicht immer ein so starkes, wie in dem mitgeteilten Versuche. Immerhin übertraf die absorptive Kraft des in oben beschriebener Weise osmierten Meerschweinchenblutes oft die des osmierten Rinderblutes. Es ergibt sich also der zwingende Schluß, daß die Behandlung der roten Blutkörperchen mit Osmiumsäure den Blutzellen eine neue Qualität verleiht, die sich in einem starken

Absorptionsvermögen für Ambozeptoren dokumentiert. Das Wesentliche dieser absorptiven Kraft ist der Mangel an Spezifität, und damit ist erwiesen, daß das Bindungsvermögen des osmierten Blutes nichts mit den Rezeptorfunktionen der nativen Blutzellen zu tun hat. Daß derart alteriertes Blut nicht mehr immunisierend wirkt, kann nicht auffällig erscheinen, da das unspezifische Absorptionsvermögen einen Schluß auf das Vorhandensein ambozeptorbindender Rezeptoren nicht zuläßt. Die Verwertung der Versuchsergebnisse im Sinne Cocas ist demnach irrig.

Allerdings wäre es denkbar, daß die Bindung der homologen Ambozeptoren durch das osmierte Rinderblut durch das Zusammenwirken zweier Faktoren, die durch Osmiumsäurewirkung bedingte Absorptionskraft und das spezifische Rezeptorbindungsvermögen, verursacht ist. Hatte diese Annahme bereits durch den Umstand, daß osmiertes Meer-schweinchenblut in der Regel stärker wirkt als die homologe osmierte Blutart, an Wahrscheinlichkeit verloren, so glaubte ich doch eine nähere Analyse des Einflusses der Osmiumsäure auf das Ambozeptorbindungsvermögen der Rezeptoren versuchen zu sollen. Es handelte sich also um die Frage, ob die Osmiumsäure die bindende Funktion der Rezeptoren vernichtet oder intakt läßt, und ihre Beantwortung erschien deshalb nicht ganz leicht, weil eben mit dem möglichen Vorgang der Zerstörung des Rezeptors eine zweite Einwirkung der Osmiumsäure vergesellschaftet ist, die, wie wir gesehen haben, zu einer mit dem Ambozeptorbindungsvermögen in formaler Analogie stehenden Reaktionsfähigkeit führt. Um daher zwei etwa in Betracht kommende entgegengesetzt wirkende Einflüsse der Osmiumsäure zu isoliertem Ausdruck zu bringen, schien es geboten, die zur Vorbehandlung des Blutes dienenden Osmiumsäuremengen quantitativ abzustufen. Denn es war denkbar, daß bei geeigneter Konzentration nur die eine Wirkung der Osmiumsäure wesentlich in Erscheinung tritt. Diese Erwartung hat sich in der Tat erfüllt, so daß ich in der Lage war, den zerstörenden Einfluß der Osmiumsäure auf das Rezeptorbindungsvermögen der roten Blutzellen direkt zu erweisen. Ein Beispiel der in dieser Richtung ausgeführten Versuche sei hier angeführt.

Es wurden 5 Mischungen von Blut und Osmiumsäure angesetzt. Jedes Röhrchen enthielt je 2,5 ccm serumfrei gewaschenes Rinderblut, je 6,75 ccm physiologischer Kochsalzlösung und je 2 ccm Osmiumsäurelösung verschiedener Konzentration. Die letztere betrug:

- I. 0,5-proz. Osmiumsäure,
- II. 1,0-proz. „
- III. 1,5-proz. „
- IV. 2,0-proz. „
- V. 2,5-proz. „

Die Mischungen wurden nach  $\frac{1}{2}$ -stündigem Aufenthalt bei Zimmer-temperatur zentrifugiert, die Sedimente 4mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und auf je 50 ccm aufgefüllt. Es resultierten also 5-proz. Aufschwemmungen in verschiedenem Grade osmierten Rinderblutes. Dieselben wurden in gewöhnlicher Weise zu Bindungsversuchen benutzt, indem je 1 ccm in 5 Parallelreihen mit absteigenden Mengen inaktivierten Immunserums eine Stunde lang bei 37° digeriert wurde. Sodann wurde zentrifugiert. Die Abgüsse wurden mit je 0,25 ccm einer 20-proz. Rinderblutaufschwemmung und je 0,15 ccm mit gleichen Teilen physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Meerschweinchenserums digeriert. Das Ergebnis ist in Tabelle III notiert. In derselben ist der Hauptversuch (I—V) von zwei Kontrollreihen (A und B) eingeschlossen, von denen die eine (A) einen gleichzeitig angestellten Bindungsversuch unter Verwendung des normalen Rinderblutes betrifft, die andere (B) die hämolytische Wirkung des nativen Immunserums unter gleichen Bedingungen registriert.

In Tabelle IV ist ein entsprechender Versuch wiedergegeben, für welchen Meerschweinchenblut, in Reihe A normal, in I—V in analoger Weise mit Osmiumsäure vorbehandelt, zur Absorption des Immunserums diente.

Tabelle III.

Mengen des Immun- serums  ccm	Hämolyse von Rinderblut (0,05 ccm) durch 0,075 ccm Meerschweinchen- serum und Immunserum; letzteres:						
	nach Digerieren mit:						B nativ
	A normalem Rinder- blut	osmiertem Rinderblut, Konzentration der Osmiumsäure:					
		I 0,5-proz.	II 1,0-proz.	III 1,5-proz.	IV 2,0-proz.	V 2,5-proz.	
0,025	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett
0,015	fast kmpl.	„	„	„	„	„	„
0,01	stark	„	„	„	„	fast kmpl.	„
0,005	wenig	„	„	„	„	wenig	„
0,0025	Spürchen	„	„	fast kmpl.	stark	Spürchen	„
0,0015	0	wenig	wenig	wenig	Spur	0	„
0,001	0	Spürchen	Spürchen	Spürchen	0	0	„
0,0005	0	0	0	0	0	0	mäßig
0,00025	0	0	0	0	0	0	wenig
0	0	0	0	0	0	0	0



Tabelle IV.

Mengen des Immun- serums  ccm	Hämolyse von Rinderblut (0,05 ccm) durch 0,075 ccm Meer- schweinchenserum und Rinderblutimmunserum; letzteres nach Digerieren mit:					
	A normalem Meer- schwein- chenblut	osmiertem Meerschweinchenblut, Konzentration der Osmiumsäure:				
		I 0,5-proz.	II 1,0-proz.	III 1,5-proz.	IV 2,0-proz.	V 2,5-proz.
0,025	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett
0,015	"	"	"	"	"	Spur
0,01	"	"	"	"	fast kompl.	Spürchen
0,005	"	"	"	fast kompl.	wenig	0
0,0025	"	"	"	wenig	Spur	0
0,0015	"	mäßig	wenig	Spur	Spürchen	0
0,001	"	wenig	Spur	Spürchen	0	0
0,0005	wenig	Spur	Spürchen	0	0	0
0,00025	Spur	Spürchen	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

Die Betrachtung der beiden Tabellen gestattet, eine eindeutige Antwort auf die gestellte Frage zu geben. Besonders charakteristisch ist die sprunghafte Abnahme des Ambozeptorbindungsvermögens durch eine Behandlung des Rinderblutes mit schwachen Osmiumsäurelösungen, wie sie sich aus Tabelle III (A—I—II) ergibt. Diesem Sinken folgt mit zunehmender Osmiumsäurekonzentration ein allmählicher Anstieg der absorptiven Kraft (Tabelle III [III—V]). Damit ist der sichere Beweis erbracht, daß bei der Einwirkung der Osmiumsäure zwei verschiedene Vorgänge zu unterscheiden sind:

1) die Aufhebung der Rezeptorfunktion, eine Wirkung, die man wohl auf eine Zerstörung durch Oxidation beziehen darf;

2) das Entstehen eines der Spezifität entbehrenden Absorptionsvermögens.

Ob letzteres bereits durch den schwächsten Grad der Osmierung in Erscheinung tritt, oder ob das geringe Bindungsvermögen der derart behandelten Blutkörperchen noch auf einen Rest funktionstüchtiger Rezeptoren zu beziehen ist, kann nicht ohne weiteres entschieden werden. Die Versuche mit osmiertem Meerschweinchenblut (Tabelle IV) zeigen, daß

bereits geringgradige Behandlung mit Osmiumsäure ein gewisses Absorptionsvermögen bewirkt, das dann in vollständiger Parallele zu dem Verhalten des Rinderblutes proportional der gesteigerten Osmiumsäurekonzentration zunimmt. Immerhin weist aber das schwach osmierte Rinderblut ein etwas stärkeres Bindungsvermögen, als das gleichartig osmierte Meerschweinchenblut auf, und da bei stärkeren Osmiumsäurekonzentrationen das Verhältnis sich gerade umgekehrt gestaltet, so dürfte man nicht fehlgehen, wenn man annimmt, daß bei schwacher Osmiumsäurewirkung neben der bereits eingetretenen absorptiven Kraft noch ein geringer Rest des Rezeptorbindungsvermögens bestehen bleibt, während bei höheren Konzentrationen die vollständige Zerstörung der Rezeptoren mit einer außerordentlichen Steigerung des Absorptionsvermögens vergesellschaftet ist.

Mit dieser Anschauung stimmen auch die Immunisierungsversuche, welche, wenn auch nicht in größerem Maßstabe vorgenommen, doch eine hinreichende Orientierung gestatten dürften, gut überein. Daß stark osmiertes Rinderblut sich auch in meinen Versuchen in Uebereinstimmung mit den Angaben Cocas zur Hämolysinerzeugung ungeeignet erwies, ist bereits erwähnt worden. Bei den Versuchen, welche die Immunisierung mit verschiedengradig osmiertem Rinderblut betrafen, gingen leider eine Reihe von Kaninchen vorzeitig ein. Immerhin dürfte die folgende Versuchsserie genügend demonstrativ sein.

Die Sedimente von je 25 ccm gewaschenen Rinderblutes wurden mit 40 ccm physiologischer Kochsalzlösung und je 20 ccm Osmiumsäurelösung von der Konzentration

- a) 0,5-proz.
- b) 1,0 „
- c) 1,5 „

$\frac{1}{2}$  Stunde bei Zimmertemperatur digeriert. Sodann wurden die 4mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen und abzentrifugierten Sedimente wieder auf ein Volumen von je 25 ccm gebracht. Je 5 ccm davon dienten zur Herstellung 5-proz. Aufschwemmungen für den Absorptionsversuch. Das Ergebnis desselben ist in Tabelle V notiert.

Die restierenden 20 ccm dienten zur Immunisierung. Je 2 Kaninchen erhielten je 10 ccm intraperitoneal. Gleichzeitig wurden 2 Kaninchen mit normalem Rinderblut in entsprechender Weise vorbehandelt. Die Prüfung der Sera erfolgte 12 Tage nach der Injektion durch Digerieren absteigender Serummengen mit je 1 ccm 5-proz. Rinderblut und 0,1 ccm Meerschweinchen-

serum. 3 Kaninchen waren vorzeitig eingegangen, so daß mir nur 5 Sera zur Bestimmung übrig blieben. Die Ermittlung ihres Ambozeptortiters ist aus Tabelle VI ersichtlich.

Tabelle V.  
Ermittlung des Bindungsvermögens.

		Hämolyse von 0,05 ccm Rinderblut durch 0,075 ccm Meer- schweinchenserum und Immunserum; letzteres:			
Mengen des Immun- serums  ccm	nach Digerieren mit: .				Nativ
	normalem Rinderblut	osmiertem Rinderblut, Konzentration der Osmiumsäure:			
		a 0,5-proz.	b 1,0-proz.	c 1,5-proz.	
0,01	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett
0,005	fast komplett	„	„	„	„
0,0025	Spur	„	„	„	„
0,0015	Spürchen	„	fast komplett	mäßig	„
0,001	„	wenig	wenig	wenig	fast „ kmpl. wenig Spur
0,0005	„	Spur	Spur	Spürchen	
0,00025	„	Spürchen	Spürchen	„	
0,00015	„	„	„	„	

Tabelle VI.  
Ermittlung des Immunisierungsvermögens.

Hämolyse von 0,05 ccm Rinderblut durch 0,1 ccm Meerschweinchenserum und die Sera von Kaninchen, welche vorbehandelt wurden mit:					
Menge des Immun- serums  ccm	normalem Rinderblut	osmiertem Rinderblut, Konzentration der Osmiumsäure:			
		a 0,5-proz.	b 1,0-proz.		c 1,5-proz.
			I	II	
0,5	komplett	komplett	komplett	mäßig	Spur
0,25	"	"	"	wenig	"
0,15	"	"	"	Spur	Spürchen
0,1	"	"	fast komplett	"	"
0,05	"	"	mäßig	Spürchen	0
0,025	"	"	wenig	0	0
0,015	"	fast komplett	Spürchen	0	0
0,01	"	stark	0	0	0
0,005	"	wenig	0	0	0
0,0025	"	Spur	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Der Bindungsversuch (Tabelle V) ist nicht so markant ausgefallen wie die übrigen, wobei wohl der Umstand eine

gewisse Rolle spielte, daß das Meerschweinchenserum in diesem Falle bereits an und für sich eine geringgradige Hämolyse des Rinderblutes bewirkte. Jedoch zeigt er in anschaulicher Weise wiederum die Abnahme des Bindungsvermögens bei schwacher Osmiumsäurebehandlung und die darauf folgende Steigerung bei stärkerer Osmierung. Besonders charakteristisch ist aber der Vergleich von Bindungs- und Immunisierungsvermögen der in verschiedenen Grade osmierten roten Blutzellen. Bei Verwendung der schwächsten Osmiumsäurelösung (Reihen a in Tabelle V und VI) ist bei geringstem Bindungsvermögen der stärkste Grad immunisierender Wirkung wahrzunehmen, während bei starker Osmierung (Reihen c) das Ergebnis den von Coca erhobenen Befunden parallel ist, indem einer starken Absorptionskraft fast völliger Schwund der Antigenwirkung gegenübersteht. Auf Grund der beschriebenen Versuchsergebnisse erhellen aber trotz des scheinbaren Bestehens einer Unabhängigkeit der beiden Funktionen die intimen Beziehungen, in welchen sie zueinander stehen. Die schwache Osmiumsäurelösung (0,5-proz.) läßt eben bei reichlicher Zerstörung der Rezeptoren einen gewissen Anteil intakt, der sich sowohl in geringgradigem Bindungsvermögen, als auch durch die — entsprechend verringerte — Fähigkeit zur Auslösung von Antikörpern dokumentiert. Bei stärkerer Osmiumsäurekonzentration (1-proz.) ist offenbar noch eine sehr geringe Rezeptormenge vorhanden geblieben, die zu einer geringgradigen Hämolysinbildung ausreicht (die quantitativen Unterschiede in der ausgebildeten Ambozeptormenge bei den beiden Versuchstieren weisen nur auf die vielfache Erfahrung hin, daß individuelle Differenzen in der Fähigkeit der Antikörperproduktion bestehen). Das Bindungsvermögen hat dabei bereits zugenommen, durch das Hinzutreten der infolge der Osmiumsäurewirkung veranlaßten unspezifischen Quote. Bei Verwendung der stärksten Osmiumsäurelösung (1,5-proz.) endlich ist der zerstörende (oxydierende) Einfluß der Osmiumsäure so weit fortgeschritten, daß die Rezeptorfunktion nahezu aufgehoben ist. Daher tritt das Immunisierungsvermögen fast gar nicht mehr in Erscheinung, während die absorptive Kraft noch eine weitere Zunahme erfahren hat.

So hat die detaillierte Analyse des von Coca begonnenen Studiums der Osmiumsäurewirkung dazu geführt, gerade die gesetzmäßigen Beziehungen, welche zwischen spezifischem Bindungs- und Immunisierungsvermögen der Erythrocyten bestehen, von neuem zu veranschaulichen. Die mitgeteilten Versuche weisen in der Tat einen vollständigen Parallelismus von Ambozeptorbindung in vitro und Immunisierungsfähigkeit auf und entsprechen somit durchaus der in der Seitenkettentheorie zum Ausdruck gebrachten Anschauung, nach welcher der die Bindung des Ambozeptors vermittelnde Rezeptor gleichzeitig auch für die immunisatorische Auslösung der spezifischen Ambozeptoren maßgebend ist. Ob für den Uebertritt der letzteren ins Blut noch ein zweites Moment erforderlich ist, muß dahingestellt bleiben. Ein solches ist auf Grund der Rezeptortheorie sehr wohl denkbar und würde ihre Prinzipien unbeeinflusst lassen. Die Versuche mit Osmiumsäure dürften aber nicht den geringsten Anhaltspunkt für diese Annahme bieten. Wenn sie auch zu direkten Schlüssen auf andersartige Untersuchungen, welche zu analogen Ergebnissen wie Cocas Experimente führten, nicht berechtigen, so müssen sie doch auch für solche, und besonders diejenigen Forssmanns über das Schicksal der in Kollodiumkapseln eingeschlossenen Stromata eine Mahnung zur Vorsicht in der Beurteilung sein. Nachdem sich aus unseren Untersuchungen ergeben hat, daß Einflüsse, welche zu einer Aufhebung der Rezeptorfunktionen führen, gleichzeitig eine Alteration der Blutzellen bewirken können, welche ein nicht-spezifisches Absorptionsvermögen für Ambozeptoren im Gefolge hat, wird man bei ähnlichen Ergebnissen stets mit der hier deutlich charakterisierten Quelle der Täuschung rechnen müssen.

Worauf die durch Osmiumsäurewirkung verursachte Fähigkeit der Blutzellen, die Ambozeptorwirkung zu verhindern, beruht (Zerstörung, Adsorption), soll nicht näher erörtert werden. Wahrscheinlich erscheint wohl jedenfalls die in den obigen Ausführungen vertretene Annahme, daß es sich um eine Adsorptionswirkung handelt. Das Phänomen dürfte demnach in die Reihe von Adsorptionserscheinungen gehören, wie

sie bei Immunstoffen besonders von Landsteiner und seinen Mitarbeitern beschrieben wurden. Allerdings würde es sich bei der Wirkung des osmierten Blutes, wie unsere Versuche zeigen, um einen besonders hohen Grad physikalischen Adsorptionsvermögens handeln. Es liegt nahe, anzunehmen, daß durch Reduktion entstandenes metallisches Osmium in so feiner kolloidaler Form auf den Blutzellen niedergeschlagen ist, daß eine zur Adsorption besonders geeignete Oberflächenwirkung resultiert. Wie dem aber auch sei, jedenfalls hat die durch die Osmierung der Blutzellen verursachte Anti-ambozeptorwirkung, für welche der Mangel an Spezifität charakteristisch ist, mit dem Ambozeptorbindungsvermögen der Rezeptoren nichts mehr zu tun <sup>1)</sup>).

#### Zusammenfassung.

1) Der von Coca mitgeteilte Befund, nach welchem rote Blutkörperchen unter dem Einfluß stärkerer Osmiumsäurelösung nicht mehr befähigt sind, Ambozeptoren immunisatorisch auszulösen, aber Ambozeptoren unwirksam machen, konnte bestätigt werden.

2) Jedoch ist die Anti-ambozeptorwirkung des stark osmierten Rinderblutes von dem Ambozeptorbindungsvermögen des nativen Blutes scharf zu unterscheiden; denn:

a) osmiertes Meerschweinchenblut absorbiert die Ambozeptoren in gleicher Weise, oft noch stärker, als osmiertes Rinderblut;

1) In diesem Zusammenhange sei auch auf einige Beobachtungen verwiesen, welche eine gewisse Labilität der hämolytischen Immunambozeptoren gegenüber physikalischen Einflüssen erkennen lassen. Ich wurde mehrmals bei der Titrierung von Ambozeptorverdünnungen in physiologischer Kochsalzlösung, die einige Stunden vorher angesetzt und auf hämolytische Kraft geprüft waren, durch eine nicht unerhebliche Abnahme der Wirkung überrascht. Systematische vergleichende Prüfungen von Immunserumverdünnungen sofort nach ihrer Bereitung und nach einstündigem Schütteln oder 1—2-stündigem Aufbewahren führten in der Tat oft zur Feststellung einer Abnahme der Ambozeptorwirkung, besonders dann, wenn es sich um starke Verdünnungen (1:1000) handelte. Regelmäßig konnte die Erscheinung aber nicht reproduziert werden.

b) schwächere Osmiumsäurelösungen bedingen eine sehr erhebliche Abnahme des spezifischen Ambozeptorbindungsvermögens, während erst bei stärkerer Osmierung die starke Bindungskraft in Erscheinung tritt.

3) Die Osmiumsäure wirkt also in doppelter Weise auf die roten Blutkörperchen, indem sie:

a) die ambozeptorbindenden Rezeptoren zerstört oder dem Nachweise entzieht (Oxydation);

b) den osmierten Blutzellen ein der Spezifität ermangelndes Adsorptionsvermögen für Ambozeptoren verleiht (Wirkung des durch Reduktion entstandenen kolloidalen Osmiums?).

4) Das Studium der Osmiumsäurewirkung führt zur Feststellung eines engen Parallelismus zwischen Immunisierungs- und Ambozeptorbindungsvermögen der roten Blutkörperchen. Es liefert im Gegensatz zu der von Coca gezogenen Konsequenz keinen Anhaltspunkt dafür, daß Rezeptoren bei intaktem Ambozeptorbindungsvermögen für die Antikörperbildung untauglich werden können.

5) Die Identität des ambozeptorbindenden und des für die Antikörperbildung notwendigen Rezeptors im Sinne der Seitenkettentheorie kommt in dem durchaus parallelen Einfluß der Osmiumsäure auf beide analysierbare Funktionen zum deutlichsten Ausdruck. Die im Sinne einer Differenzierung zweier unabhängigen Komponenten gedeuteten Versuche Forssmanns über das Verhalten der in Kollodiumsäckchen eingeschlossenen Stromata nach längerem Aufenthalt in der Bauchhöhle erscheinen bei kritischer Betrachtung nicht beweiskräftig und können die in der Seitenkettentheorie ausgedrückte Auffassung eines intimen Zusammenhanges zwischen Ambozeptorbindungs- und Immunisierungsvermögen nicht erschüttern.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem städtischen Krankenhaus für Infektionskrankheiten  
zu Kobe, Japan.]

**Weitere Studien über verschiedene Typen von  
Dysenteriebacillen und ihre Differenzierung durch die  
Komplementbindungsmethode.**

Von

Dr. T. Amako,      und      Dr. K. Kojima,  
Direktor.                      Oberarzt.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. August 1909.)

In einer früheren Arbeit hat sich der eine von uns [Amako (2)] mit der „Dysenterieepidemie und den Bacillentypen“ beschäftigt und eine Anzahl der Dysenteriebacillen, die von den Kranken bei der Dysenterieepidemie in der Stadt Kobe im Jahre 1905 gefunden wurden, nach dem Vorgehen von Prof. Shiga (1) in bezug auf die Fermentierung der Kohlehydrate, sowie auf Grund der Immunreaktionen mit spezifischen Immunsereis in 5 Typen geteilt.

Nun schien es uns interessant, zu untersuchen, wie sich die verschiedenen Typen bei den Epidemien in den letzten Jahren in einer und derselben Gegend verhalten. Um diese Frage zu lösen, haben wir in jedem Jahre sorgfältig die bakteriologische Untersuchung bei den Dysenteriekranken vorgenommen, aus den hierbei gefundenen Dysenteriebacillen wurden die Typen einerseits durch Fermentierung der Kohlehydrate, andererseits durch Agglutination und Bakteriolyse mit spezifischen Immunsereis festgestellt.

Da die biologischen Eigenschaften der 5 Typen der Dysenteriebacillen schon in der Arbeit von Shiga (1), sowie in der von Amako (2) ausführlich beschrieben sind, so werden wir hier bloß ihr Verhalten gegen Kohlehydrate (Mannit, Glukose, Galaktose, Fruktose, Maltose, Saccharose, Dextrin und Laktose) kurz wiedergeben:

Typus I (Shigas Originaltypus) fermentiert Glukose, Galaktose, Fruktose und Saccharose, dagegen Maltose und Laktose nicht. Die Fermentierung von Dextrin war so un-

32\*



gleichmäßig, daß manche Stämme von dem III. Typus dasselbe spalteten, während einige nicht dazu imstande waren. Typus IV und V spalten alle 7 Kohlehydrate außer Laktose.

Die Differenzierung der Bacillentypen durch Fermentierung von Kohlehydraten war nicht selten mit Schwierigkeiten verbunden, weil die Fermentierung bei der wiederholten Prüfung nicht immer ganz übereinstimmte. Hierbei muß man natürlich auch berücksichtigen, daß das käufliche Präparat von Kohlehydrat sehr oft nicht in reinem Zustand ist, und ferner, daß Kohlehydrate bei der Dampfsterilisation oft leicht zersetzt werden.

In Tabelle I ist die Anzahl der Dysenteriekranken in den Jahren 1905, 1906 und 1908 angegeben, die in unserem Krankenhaus aufgenommen und der bakteriologischen Untersuchung unterworfen wurden. Im Jahre 1907 wurde auch eine kleine Anzahl von Dysenteriekranken aufgenommen, bei denen wir aber wegen der heftigen Choleraepidemie auf die bakteriologische Untersuchung verzichten mußten.

Tabelle I.

Jahrgang	I. Typus	II. Typus	III. Typus	IV. Typus	V. Typus	Summe
1905	108	202	9	169	36	524
1906	5	15	27	18	2	67
1908	2	3	0	4	6	15
Summe	115	220	36	191	44	606

Wie aus dieser Tabelle zu ersehen ist, waren die Kranken im Jahre 1905 von Typus I, II und IV weit zahlreicher als von Typus III und V. Typus III war besonders selten. Dagegen waren im nächsten Jahre (1906) die Kranken von Typus III weit zahlreicher als von anderen Typen. Typus I und V waren in diesem Jahre nur sehr gering. Im Jahre 1908 waren aber Erkrankungen an Typus III gänzlich ausgeblieben. Was Typus I anbetrifft, so wurden im Jahre 1906 nur 5 und im Jahre 1908 2 Fälle gezählt, während bei der Epidemie im Jahre 1905 die Erkrankungsziffer eine recht hohe war.

Daraus ersieht man leicht, daß die Verbreitung der verschiedenen Typen von Dysenteriebacillen bei den Epidemien in den zitierten Jahren selbst an ein und demselben Orte ganz verschieden ist.

### Komplementbindungsversuche mit den verschiedenen Typen der Dysenteriebacillen.

Wie schon eine Reihe von Autoren, wie Leuchs (3), Ballner und Reibmayr (4), Leuchs und Schöne (5), Hirschfeld (6), de Besche und Kon (7) etc., gezeigt haben, kann man die Bakterien ähnlicher Arten durch Komplementbindung mit Sicherheit differenzieren. Nun wollten wir untersuchen, wie sich die Typen der Dysenteriebacillen in bezug auf das Komplementbindungsphänomen zueinander verhalten.

Zu diesen Versuchen wurden Bakterienextrakte von einer 24 Stunden alten Agarkultur in folgender Weise hergestellt:

Eine Schrägagarkultur wurde in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, eine Stunde lang bei 60° erhitzt, 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann zentrifugiert. Die auf diese Weise erhaltene schwach getrübe Flüssigkeit wurde zum Versuche benutzt.

Immunserum für den einzelnen Typus von Dysenteriebacillen wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit den einzelnen Bakterienkulturen hergestellt. Die zum Versuche benutzten Sera zeigten folgende Agglutinationstiters.

Tabelle II.

Serum	Typus I	Typus II	Typus III	Typus IV	Typus V
I. Typusserum	300	40	40	0	20
II. „	40	1000	1000	80	300
III. „	80	1000	1500	300	300
IV. „	0	300	80	1500	100
V. „	100	300	300	100	2000

Das hämolytische Serum wurde von Kaninchen, die mit Hammelblutkörperchen vorbehandelt waren, gewonnen.

Beim Versuche wurden 0,1 ccm Extrakt fallende Mengen Serum in Glasröhrchen gemischt, und als Komplement frisches Meerschweinchenserum in einer Verdünnung 1:10 zugesetzt. Dann wurden alle Röhrchen eine Stunde lang bei 37° in einen Brutschrank gestellt. Darauf wurde hämolytisches Serum in einer doppelt komplett lösenden Dosis, sowie 1 ccm einer 5-proz. Hammelblutkörperchen - Aufschwemmung zugesetzt. Jedes Reagens betrug 1 ccm an Volumen, so daß jedes Röhrchen 5 ccm enthielt.

Die Ergebnisse der Versuche fassen wir für die einzelnen Typen in folgenden Tabellen III bis VII zusammen.

Tabelle III.  
Versuche mit dem Kaninchenserum des I. Typus.

No.	Menge des Serums	Extrakt vom				
		I. Typus	II. Typus	III. Typus	IV. Typus	V. Typus
1	0,2	+	+	+	±	+
2	0,1	+	+	±	—	+
3	0,05	+	±	±	—	±
4	0,025	+	—	—	—	±
5	0,01	+	—	—	—	—
6	0,005	+	—	—	—	—
7	0,0025	+	—	—	—	—
8	0,001	+	—	—	—	—
9	0,0005	±	—	—	—	—
10	0,00025	±	—	—	—	—
11	0,0001	—	—	—	—	—

Zeichenerklärung: + komplette Hemmung; ± inkomplette Hemmung; — keine Hemmung.

Tabelle IV.  
Versuche mit dem Kaninchenserum des II. Typus.

No.	Menge des Serums	Extrakt vom				
		I. Typus	II. Typus	III. Typus	IV. Typus	V. Typus
1	0,2	+	+	+	+	±
2	0,1	+	+	+	+	±
3	0,05	±	+	+	+	—
4	0,025	±	+	+	+	—
5	0,01	—	+	+	±	—
6	0,005	—	+	±	±	—
7	0,0025	—	+	±	±	—
8	0,001	—	+	±	—	—
9	0,0005	—	±	—	—	—
10	0,00025	—	±	—	—	—
11	0,0001	—	±	—	—	—

Tabelle V.  
Versuche mit dem Kaninchenserum des III. Typus.

No.	Menge des Serums	Extrakt vom				
		I. Typus	II. Typus	III. Typus	IV. Typus	V. Typus
1	0,2	+	+	+	+	+
2	0,1	±	+	+	+	+
3	0,05	±	+	+	+	+
4	0,025	±	+	+	+	±
5	0,01	—	+	+	+	—
6	0,005	—	+	+	±	—
7	0,0025	—	+	+	±	—
8	0,001	—	+	+	—	—
9	0,0005	—	±	+	—	—
10	0,00025	—	±	±	—	—
11	0,0001	—	—	±	—	—

Tabelle VI.

Versuche mit dem Kaninchenserum des IV. Typus.

No.	Menge des Serums	Extrakt vom				
		I. Typus	II. Typus	III. Typus	IV. Typus	V. Typus
1	0,2	+	+	+	+	+
2	0,1	+	+	+	+	+
3	0,05	±	+	+	+	+
4	0,025	—	+	+	+	+
5	0,01	—	+	+	+	±
6	0,005	—	±	±	+	±
7	0,0025	—	—	±	+	—
8	0,001	—	—	—	+	—
9	0,0005	—	—	—	±	—
10	0,00025	—	—	—	—	—
11	0,0001	—	—	—	—	—

Tabelle VII.

Versuche mit dem Kaninchenserum des V. Typus.

No.	Menge des Serums	Extrakt vom				
		I. Typus	II. Typus	III. Typus	IV. Typus	V. Typus
1	0,2	+	+	+	+	+
2	0,1	+	+	+	+	+
3	0,05	+	+	+	+	+
4	0,025	+	±	+	+	+
5	0,01	±	±	+	±	+
6	0,005	—	—	±	—	+
7	0,0025	—	—	—	—	+
8	0,001	—	—	—	—	+
9	0,0005	—	—	—	—	+
10	0,00025	—	—	—	—	±
11	0,0001	—	—	—	—	±

Wie aus den Tabellen zu ersehen ist, trat die Reaktion bei dem eigenen Typus spezifisch auf, so daß das Ergebnis genau mit der Fermentierung von Kohlehydraten übereinstimmt.

Eine starke Gruppenreaktion kommt auch bei Komplementbindungsversuchen vor, wie bei der Agglutination. Um dieses Verhalten übersichtlich zu machen, wird die Durchschnittszahl des oben angegebenen Komplementbindungstiters von den einzelnen Kaninchenseris in der folgenden Tabelle angegeben.

Tabelle VIII.

Titer von	Extrakt vom				
	I. Typus	II. Typus	III. Typus	IV. Typus	V. Typus
I. Typus-Serum	0,001	0,1	0,2	0	0,1
II. " "	0,1	0,001	0,01	0,025	0
III. " "	0,2	0,001	0,0005	0,01	0,05
IV. " "	0,1	0,01	0,01	0,001	0,025
V. " "	0,025	0,05	0,01	0,025	0,0005

Aus dieser Tabelle ersieht man, daß die Gruppenreaktion allmählich von einem Typus zum anderen übergeht, wie es schon Shiga (1) und Amako (2) bei Agglutinationsversuchen beobachtet hatten.

Zur Herstellung des Kaninchenimmunserums für den Komplementbindungsversuch genügt schon eine einmalige Injektion. Bei der mehrmaligen Injektion wird die Gruppenreaktion stärker, so daß das Serum als Differenzierungsmittel ganz unbrauchbar wird.

Die Tatsache, daß das Komplementbindungsvermögen des Serums im Verlaufe der Immunisierung der Tiere weit früher auftritt, als die Agglutination, kann man auch aus folgender Tabelle IX ersehen, wie es schon Leuchs und Schoene (5) bei den Seris von Typhuskranken beobachteten. In diesem Versuche wurden die Sera am 4. Tage nach der ersten Injektion entnommen und auf Agglutination und Komplementbindungsvermögen geprüft. Diese Sera enthielten meist gar keine oder nur eine sehr geringe agglutinierende Kraft, während sie bereits eine bemerkbare komplementbindende Kraft zeigten.

Tabelle IX.

Versuche mit Kaninchenseris, die alle am 4. Tage nach der ersten Injektion (intravenös) entnommen wurden.

	Bakterien vom	Serum vom				
		I. Typus	II. Typus	III. Typus	IV. Typus	V. Typus
Agglutination	I. Typus	0	0	0	0	0
	II. "	0	+ 20	0	0	0
	III. "	0	0	0	0	0
	IV. "	0	0	0	0	0
	V. "	0	0	0	0	+ 40

	Bakterien vom	Serum vom				
		I. Typus	II. Typus	III. Typus	IV. Typus	V. Typus
Komplement- bindung	I. Typus	0,025	0	0,2	0	0,1
	II. "	0	0,025	0,025	0,1	0,2
	III. "	0	0,05	0,01	0,1	0,05
	IV. "	0	0,1	0,05	0,01	0,1
	V. "	0	0	0,1	0,1	0,25

### Zusammenfassung.

Auf Grund der vorstehend mitgeteilten Befunde gelangen wir zu folgenden Schlußfolgerungen:

1) Die Intensität der verschiedenen Typen von Dysenteriebacillen bei den einzelnen Epidemien der verschiedenen Jahre ist in bezug auf das Verhalten der Verbreitung, selbst in einer und derselben Gegend, ganz verschieden aufgetreten.

2) Die Komplementbindungsphänomene traten bei den einzelnen Typen von Dysenteriebacillen spezifisch auf, wenn sie auch starke Gruppenphänomene zeigten.

3) Zur Immunisierung von Kaninchen mit Dysenteriebacillen genügt schon eine einfache Injektion. Bei der mehrmaligen Injektion werden die Gruppenphänomene im Komplementbindungsversuch stärker, so daß das Serum als Differenzierungsmittel unbrauchbar wird.

4) Das Komplementbindungsvermögen des Serums tritt im Verlaufe der Immunisierung der Tiere weit früher auf als die agglutinierende Kraft, so daß die Sera, am 4. Tage nach der ersten Injektion entnommen, schon eine bemerkbare komplementbindende Kraft zeigten, während sie gar keine oder nur eine sehr geringgradige agglutinierende Kraft aufwiesen.

Zum Schlusse sei es uns gestattet, Herrn Prof. Dr. K. Shiga unsere Dankbarkeit für die gütige Anregung bei dieser Arbeit auszusprechen.

### Literatur.

- 1) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 60, 1908.
- 2) Ebenda.
- 3) Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 4 u. 5.
- 4) Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 13.
- 5) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 60, 1908.
- 6) Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 61, 1907.
- 7) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 62, 1909.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Laboratorium von Professor Dr. H. Wendelstadt, Bonn.]

**Stoffwechseluntersuchungen bei mit Nagana-Trypanosomen  
infizierten Kaninchen.**

Von T. Fellmer.

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. August 1909.)

2 Kaninchen vom gleichen Wurf wurden einen Monat lang täglich mit 180 g Winterkohl und 40 g Weißbrot, das in Wasser erweicht und dann stark ausgedrückt worden war, gefüttert. Sie hatten nach 3 Wochen ein ziemlich konstant bleibendes Gewicht erreicht, tägliche Schwankungen von 20 bis 30 g abgerechnet. Kaninchen A wog 3650 g, Kaninchen B 3600 g.

Vor der Infektion wurden 9 Tage lang die Ausscheidungen untersucht, und zwar auf Menge, spezifisches Gewicht und ihren Chlor-, Phosphor- und Stickstoffgehalt. Der Chlorgehalt wurde mittels Argentinum nitricum-Lösung nach Mohr, der Phosphorgehalt durch Titration mit Uranacetat und der Stickstoffgehalt nach der Kjeldahlschen Methode berechnet. Die zu den Bestimmungen nötigen Lösungen wurden mehrere Male frisch bereitet und genau eingestellt, wobei mir Herr Oberarzt Dr. Nerking behilflich war, dem ich für seine Anleitung an dieser Stelle danke.

Am 30. Jan. 1909 wurden beide Kaninchen mit 1 ccm einer Blutaufschwemmung, die viel Nagana-Trypanosomen enthielt, intraperitoneal infiziert. Die Infektion ging an; der Krankheitsverlauf war bei beiden Tieren der normale. Auffallende Temperaturschwankungen wurden nicht beobachtet. Auch die Krankheitsdauer blieb in den normalen Grenzen. Nach Kanthack, Durham, Blandford u. a. schwankt bei Kaninchen die Krankheitsdauer zwischen 13 und 58 Tagen. Kaninchen A überlebte die Infektion 50, Kaninchen B 53 Tage. Die Krankheitssymptome waren ebenfalls normal: Blepharconjunctivitis, Oedeme, die sich besonders an der Ohrwurzel lokalisierten, Anschwellungen der Schleimhäute an der Nase

und den Genitalien und starker Haarausfall. Im Blutausschlag ließen sich hin und wieder vereinzelte Trypanosomen nachweisen; erst in den letzten Tagen vor dem Tode traten sie zahlreicher auf.

Das Gewicht bei der Infektion betrug bei Kaninchen A 3650 g, bei Kaninchen B 3600 g. In den beiden Wochen nach der Infektion nahmen beide Tiere etwas ab; dann folgt eine ziemlich rasche Gewichtszunahme. In der letzten Februarwoche wog Kaninchen A 4010 g, Kaninchen B 4070 g. Von da ab trat eine allmähliche Gewichtsabnahme ein. Beim Tode wog Kaninchen A 3290 g, Kaninchen B 3410 g.

In der Zeit vom 21. Jan. 1909 bis zum 12. resp. 15. März 1909 wurde der Harn beider Tiere auf Cl, P und N untersucht. Der Kot wurde immer von einer Woche gesammelt, auf dem Heißwasserbade getrocknet, gemahlen und auf seinen N-Gehalt geprüft.

#### Harnmenge.

Bei der Harnmenge sind nur von jeder Woche die höchste und die niedrigste Ziffer angegeben.

		Kaninchen A	Kaninchen B
Vor der Infektion	21.—29. I.	105—300 ccm	88—250 ccm
1. Wochenach d. Infekt.	1.—7. II.	134—324 "	198—284 "
2. " " " "	8.—14. II.	133—360 "	130—320 "
3. " " " "	15.—21. II.	86—209 "	82—250 "
4. " " " "	22.—28. II.	61—274 "	125—224 "
5. " " " "	1.—7. III.	190—300 "	182—310 "
6. " " " "	8.—15. III.	180—295 "	128—290 "

#### Spezifisches Gewicht des Harns.

Ebenso sind auch beim spezifischen Gewicht nur von jeder Woche die höchste und die niedrigste Ziffer genannt.

		Kaninchen A	Kaninchen B
Vor der Infektion	21.—29. I.	1,020—1,031	1,011—1,027
1. Wochenach d. Infekt.	1.—7. II.	1,015—1,026	1,020—1,026
2. " " " "	8.—14. II.	1,020—1,031	1,014—1,030
3. " " " "	15.—21. II.	1,022—1,054	1,018—1,030
4. " " " "	22.—28. II.	1,014—1,051	1,025—1,035
5. " " " "	1.—7. III.	1,020—1,032	1,011—1,032
6. " " " "	8.—15. III.	1,020—1,025	1,020—1,025



## Cl-Gehalt.

Cl-Gehalt im Harn im Mittel pro Tag.			
		Kaninchen A	Kaninchen B
Vor der Infektion	21.—29. I.	0,696 g (0,49 Proz.)	0,747 g (0,49 Proz.)
1. Wochenach d. Infekt.	1.—7. II.	0,777 „ (0,36 „)	0,918 „ (0,40 „)
2. „ „ „ „	8.—14. II.	1,199 „ (0,50 „)	1,301 „ (0,47 „)
3. „ „ „ „	15.—21. II.	0,715 „ (0,46 „)	0,751 „ (0,49 „)
4. „ „ „ „	22.—28. II.	1,020 „ (0,71 „)	1,226 „ (0,71 „)
5. „ „ „ „	1.—7. III.	0,966 „ (0,39 „)	1,095 „ (0,39 „)
6. „ „ „ „	8.—15. III.	1,104 „ (0,49 „)	1,063 „ (0,50 „)

Von der 2. Krankheitswoche ab zeigt sich bei beiden Kaninchen ein starker Anstieg der Chlorausscheidung.

## P-Gehalt.

P-Gehalt im Harn im Mittel pro Tag			
		Kaninchen A	Kaninchen B
Vor der Infektion	21.—29. I.	0,051 g (0,032 Proz.)	0,057 g (0,037 Proz.)
1. Wochenach d. Infekt.	1.—7. II.	0,265 „ (0,126 „)	0,373 „ (0,164 „)
2. „ „ „ „	8.—14. II.	0,146 „ (0,061 „)	0,218 „ (0,080 „)
3. „ „ „ „	15.—21. II.	0,188 „ (0,122 „)	0,189 „ (0,117 „)
4. „ „ „ „	22.—28. II.	0,245 „ (0,171 „)	0,249 „ (0,148 „)
5. „ „ „ „	1.—7. III.	0,192 „ (0,078 „)	0,249 „ (0,088 „)
6. „ „ „ „	8.—15. III.	0,193 „ (0,086 „)	0,208 „ (0,097 „)

Die erhöhte, mit Beginn der Infektion einsetzende und bis zum Exitus konstant anhaltende P-Ausscheidung im Harn (bei Kaninchen A beträgt sie zeitweise mehr als das 5-fache, bei Kaninchen B sogar mehr als das 7-fache), läßt den Schluß zu, daß durch die Infektion mit Nagana bei den Tieren ein starker Zerfall entweder der Nukleoalbumine oder der Lecithine oder aber beider zugleich stattfindet und allmählich eine Verarmung des Organismus daran eintritt.

## N-Gehalt im Harn.

N-Gehalt im Harn im Mittel pro Tag			
		Kaninchen A	Kaninchen B
Vor der Infektion	21.—29. I.	0,851 g (0,606 Proz.)	0,845 g (0,552 Proz.)
1. Woche nach d. Infekt.	1.—7. II.	1,678 „ (0,791 „)	1,610 „ (0,702 „)
2. „ „ „ „	8.—14. II.	1,602 „ (0,679 „)	1,509 „ (0,555 „)
3. „ „ „ „	15.—21. II.	0,964 „ (0,624 „)	0,946 „ (0,607 „)
4. „ „ „ „	22.—28. II.	1,033 „ (0,724 „)	1,031 „ (0,615 „)
5. „ „ „ „	1.—7. III.	0,623 „ (0,253 „)	0,441 „ (0,156 „)
6. „ „ „ „	8.—15. III.	0,835 „ (0,373 „)	0,987 „ (0,470 „)

Bei beiden Kaninchen zeigt sich in den ersten 4 Krankheitswochen ein Anstieg der N-Ausscheidung. Die erhöhte Ausscheidung des N im Harn deutet wiederum auf eine gesteigerte Zersetzung der Eiweißkörper, und wenn man diese starke Ausscheidung von N in Verbindung bringt mit der gleichfalls erhöhten P-Ausfuhr, so ist wohl auch hier der Schluß berechtigt, daß die in Betracht kommenden Eiweißkörper außer den Lecithinen die Nukleine sind, die durch die Infektion in erster Linie angegriffen werden. Es werden also scheinbar zuerst die Zelleiweiße und das für die Organisation der Zelle wichtige Lecithin bei der Infektion mit Nagana angegriffen bzw. abgebaut.

#### N-Gehalt im Kot.

N-Gehalt im Kot im Mittel pro Tag			
	Kaninchen A		Kaninchen B
Vor der Infektion	21.—29. I.	0,444 g (3,318 Proz.)	0,591 g (3,585 Proz.)
1. Woche nach d. Infekt.	1.—7. II.	0,017 „ (0,154 „ )	0,012 „ (0,112 „ )
2. „ „ „ „	8.—14. II.	0,020 „ (0,182 „ )	0,112 „ (0,994 „ )
3. „ „ „ „	15.—21. II.	0,023 „ (0,224 „ )	0,029 „ (0,203 „ )
4. „ „ „ „	22.—28. II.	0,172 „ (2,548 „ )	0,203 „ (2,688 „ )
5. „ „ „ „	1.—7. III.	0,159 „ (2,464 „ )	0,178 „ (2,380 „ )
6. „ „ „ „	8.—15. III.	0,027 „ (0,588 „ )	0,012 „ (0,392 „ )

Im Kot ist die N-Ausfuhr vor der Infektion hoch, sinkt aber sofort nach der Infektion auffallend; bei Kaninchen A auf  $\frac{1}{25}$ , bei Kaninchen B auf  $\frac{1}{45}$ ; dieses Sinken des N-Gehaltes im Kot ist wohl durch eine bessere Ausnützung des N in der Nahrung zu erklären.

#### N-Gehalt in Kot und Harn.

Gesamt-N-Gehalt in Kot und Harn im Mittel pro Tag			
		Kaninchen A	Kaninchen B
Vor der Infektion	21.—29. I.	1,295 g	1,436 g
1. Woche nach der Infektion	1.—7. II.	1,695 „	1,623 „
2. „ „ „ „	8.—14. II.	1,622 „	1,720 „
3. „ „ „ „	15.—21. II.	0,987 „	0,975 „
4. „ „ „ „	22.—28. II.	1,205 „	1,234 „
5. „ „ „ „	1.—7. III.	0,782 „	0,619 „
6. „ „ „ „	8.—15. III.	0,861 „	0,999 „

#### Zusammenfassung.

Die Stoffwechseluntersuchungen bei mit Nagana-Trypanosomen infizierten Kaninchen ergeben mit Wahrscheinlichkeit einen starken Abbau der Zelleiweiße und des Lecithins.

*Nachdruck verboten.*

[Travail du Laboratoire d'Hygiène et de Bactériologie  
de l'Université de Gand.]

### **Recherches sur l'anaphylaxie contre les toxines et sur le mode d'absorption des toxines.**

Par le Dr. **Henri De Waele** (Gand).

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. August 1909.)

La question de l'anaphylaxie a été ouverte par les recherches de Richet<sup>1)</sup> sur la congestine et la thalassine, substances toxiques tirées d'actinies et de mollusques. Ces substances injectées sous la peau des animaux d'expérience agissent pour ainsi dire sans incubation. Elles développent une période d'anaphylaxie ou d'hypersensibilité de 14 à 32 jours pendant lesquels les phénomènes morbides sont, à une seconde injection, déterminés par des doses notablement moindres que celles qu'il faut employer à une première injection. C'est là une première caractéristique de l'anaphylaxie.

Un phénomène semblable d'hypersensibilité se produit avec les sérums; il a été étudié par une série d'auteurs. Bientôt le champ des études s'étendit encore et on apprit à connaître successivement d'autres substances à l'égard desquelles les animaux se laissent hypersensibiliser: l'albumine de l'œuf, le lait, la papaïne, les extraits d'organes animaux, des albumines végétales, bref on peut dire en général toutes les substances protéiques étrangères à l'organisme. Ces substances injectées aux animaux normaux ne développent en général pas de phénomènes morbides directs. Injectée au contraire à des animaux anaphylactisés contre ces substances, une dose normalement inoffensive produit des phénomènes toxiques et entraîne souvent la mort du cobaye en quelques minutes; de plus le délai de l'apparition des symptômes morbides est progressivement plus bref au cours d'injections successives: ce point a surtout été mis en lumière par v. Pirquet<sup>2)</sup>. Sous l'im-

1) Ann. Inst. Pasteur Paris, 1907.

2) Die Serumkrankheit, Wien (Deuticke) 1905.

pression du caractère fatal et soudain des phénomènes pathologiques, on voit dans la bibliographie se dessiner une tendance à faire de ces symptômes graves le critérium, en quelque sorte, de l'anaphylaxie. On semble oublier que l'anaphylaxie se traduit également par des manifestations moins brutales mais tout aussi caractéristiques, telles la production d'exanthèmes, de fièvre, des douleurs articulaires, telle encore la tuméfaction de ganglions lymphatiques. Ainsi, chez l'homme une injection du sérum peut donner les symptômes de la „maladie du sérum“ du 8<sup>e</sup> au 12<sup>e</sup> jour; le début de l'anaphylaxie se place vers le 15<sup>e</sup> jour. Jusqu'au 4<sup>e</sup> mois une seconde injection provoque ce syndrome avec plus de force et plus de célérité; après ce délai l'anaphylaxie diminue progressivement et n'existe plus après un an.

On sait que des injections répétées de corps microbiens sont de moins en moins bien supportées par les animaux: ces faits firent l'objet de recherches d'Arloing et de ses élèves, de Bail et de ses collaborateurs, de Rosenau et Anderson, de Pfeiffer, de Wolff-Eisner<sup>1)</sup>. Ce dernier les rattache à la bactériolyse progressivement plus rapide et à la mise en liberté de plus en plus rapide et abondante d'endotoxines, il émet à ce sujet des considérations théoriques sur les endotoxines. Restant plutôt dans le domaine des faits expérimentaux, Kraus et Doerr<sup>2)</sup> précisent ces données: ils sensibilisent les cobayes par une première injection et observent que l'anaphylaxie débute du 10<sup>e</sup> ou 14<sup>e</sup> jour, et que le phénomène devient très net du 20<sup>e</sup> au 25<sup>e</sup> jour.

Les délais, concluent ces auteurs, correspondent tout à fait à ceux que l'on a établis pour les albumines étrangères et il faut admettre qu'à côté des poisons qui donnent des antitoxines, il y a des antigènes non toxiques qui agissent dans l'organisme à la façon de toutes les albumines étrangères.

L'anaphylaxie se traduit donc primo par l'effet toxique de doses minimales ou normalement inoffensives, secundo par une abréviation de la période d'incubation.

---

1) Centralbl. f. Bakt., Or., Bd. 37, 1904.

2) Wiener klin. Wochenschr., 28. Juli 1908.

A ces deux facteurs Richet<sup>1)</sup> en a ajouté un troisième: dans une nouvelle étude de l'anaphylaxie il a démontré que l'hypersensibilité à la congestine s'affaiblit après le 30<sup>e</sup> jour et disparaît après le 50<sup>e</sup> jour. Après une période de 40 jours on voit apparaître une légère immunité.

L'immunité, dit cet auteur, a pu s'établir parce qu'il y a eu anaphylaxie.

Il nous a paru vraisemblable que ces trois éléments de la question devaient être liés étroitement entre eux et nous nous sommes demandé si les toxines ne permettraient pas une étude simultanée de ces 3 éléments du phénomène. En effet, les doses et les périodes d'incubation sont connus et on peut étudier facilement les variations de ces facteurs; de plus on connaît le pouvoir immunisant de ces substances, ce qui devait permettre de vérifier la conception de Richet sur les rapports entre l'anaphylaxie et l'immunité.

#### Première partie.

##### **L'anaphylaxie contre les toxines microbiennes.**

Quand on parle d'hypersensibilité aux toxines, on songe de suite à ces cas paradoxaux bien connus, cités par Metchnikoff (toxine diphtérique), Behring (toxine tétanique), Brieger (toxine tétanique), Salomonsen-Madsen (toxine diphtérique), dans lesquels il s'agit de chevaux bien immunisés, dont le sérum présente un titre antitoxique élevé et qui succombent à une nouvelle injection de toxine. Ces cas sont certainement plus compliqués que ceux qui nous occupent ici et qui se limitent à l'hypersensibilité développée chez un animal neuf, par une seule injection, et avant que des antitoxines aient apparu manifestement dans leur organisme.

Cependant c'est à quelques recherches faites pour élucider le problème de l'hypersensibilité de ces chevaux, que l'on doit les rares données que l'on trouve dans la bibliographie et que l'on puisse rattacher à notre sujet.

Behring et Kitaskima<sup>2)</sup> constatèrent qu'il est impossible d'immuniser des cobayes contre la toxine diphtérique

1) Annal. Inst. Pasteur, 1907.

2) Berl. klin. Wochenschr., 1901, No. 6.

même en partant de doses très faibles (les animaux étaient injectés tous les 2 jours): les animaux meurent avant que la somme des quantités injectées ait atteint une dose mortelle minima; on peut difficilement interpréter ces faits comme dûs à l'accumulation.

Knorr<sup>1)</sup> avait fait la même constatation pour la toxine tétanique; ainsi, s'il injecte à des cobayes tous les jours  $\frac{1}{50}$  de la dose mortelle minima, les animaux sont fort malades après avoir reçu au total  $\frac{1}{5}$  resp.  $\frac{1}{2}$  de la dose mortelle minima et succombent au 40<sup>e</sup> jour en recevant la 40<sup>e</sup> injection c. à. d. après n'avoir reçu que les  $\frac{4}{5}$  de la dose mortelle. S'il injecte tous les jours  $\frac{1}{10}$  resp.  $\frac{1}{20}$  de la dose mortelle minima les animaux sont malades respectivement avec 3 et 6 et avec 5 et 10 injections et succombent en recevant les dernières injections complétant la dose mortelle. Les lapins soumis aux mêmes conditions d'expérience résistent beaucoup mieux et ne succombent qu'exceptionnellement.

Nous nous sommes servi dans nos expériences de la toxine diphtérique et de la ricine (Merck). Cette dernière surtout nous permettait d'étudier simultanément les phénomènes chez des animaux à réceptivité très différente (la souris et le lapin) et de rechercher les manifestations d'anaphylaxie locale par instillations successives dans les culs de sac conjonctivaux.

Pour l'exposé de nos recherches nous recourrons à des tableaux résumant nos protocoles d'expériences. Mieux que toute autre façon on peut ainsi les présenter comparativement et avec un aperçu d'ensemble.

Toxine diphtérique W: dose mortelle 0,06 à 0,08.

I. Injection d'une dose faible suivie d'une dose faible.

Cobaye 50	Cobaye 51
12 X. Inj. sous-cut. 0,002: très peu d'oedème.	Inj. sous-cut. 0,002: très peu d'oedème.
17 X. Inj. sous-cut. 0,002: oedème plus prononcé, ganglions modérément gonflés.	
21 X.	Inj. sous-cut. 0,002: presque pas d'oedème, ganglions très tuméfiés.

Une réinjection à dose faible faite après 5 jours donne un oedème plus accusé et un retentissement ganglionnaire

1) Habilitationsschrift, Marburg 1895.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. III.

modéré; faite après 9 jours elle ne donne presque pas d'oedème et un gonflement ganglionnaire accusé.

II. Injection d'une dose faible suivie d'une dose forte.

	Cobaye 52	Cobaye 53
12. X.		Inj. sous-cut. 0,002: très peu d'oedème.
17. X.	Inj. sous-cut. 0,06: exsudat.	Inj. sous-cut. 0,06: exsudat double de celui du cob. 52; mort en 36 heures.

survie.

La réinjection d'une dose submortelle faite 5 jours après une injection faible provoque la mort en un délai minimum; anaphylaxie manifeste.

III. Toxine diphtérique W: dose mortelle 0,06—0,08.

1. Injection anaphylactisante 0,002, sous-cutanée, faite						
au le	Cobaye 54 4 XI.	Cob. 55 7 XI.	Cob. 56 10 XI.	Cob. 57 13 XI.	Cob. 58 16 XI.	Cob. 59 19 XI.
2. Réinjection d'une dose infra-mortelle 0,05 le 21 XI. c. à d.						
après	17 jours	14 jours	11 jours	8 jours	5 jours	2 jours
22 XI.	oedème prononcé	oedème prononcé	oedème	oedème	oedème	oedème
23 XI.	.	.	malade	malade	malade	malade
24 XI.	.	.	†	†	.	†
25 XI.	ass. mal.	ass. mal.	.	.	†	.
26 XI.	.	.	.	.	.	.
27 XI.	.	guéri	.	.	.	.
28 XI.	.	.	.	.	.	.
29 XI.	.	.	.	.	.	.
30 XI.	.	.	.	.	.	.
1. XII.	†	vit	.	.	.	.
2 XII.	.	.	.	.	.	.

Une dose submortelle injectée après une dose très faible est sûrement mortelle jusqu'au 11<sup>e</sup> jour: anaphylaxie manifeste.

I. Ricine — Souris.

Solution de 1:10000: 1 cc † 36 heures, 0,5 cc † 60 heures.

1. Injection sous-cutanée anaphylactisante de 0,5 cc de 1:10000,									
le	18 X.	19 X.	20 X.	21 X.	22 X.	23 X.	24 X.	25 X.	
2. Réinjection sous-cutanée d'une dose 2 fois mortelle le 26 X. c. à d.									
après	8	7	6	5	4	3	2	1 jour	contrôle
après 12 heures	.	.	.	.	.	.	.	.	.
" 24 "	.	.	.	.	.	.	.	.	.
" 36 "	.	†	†	†	†	.	†	.	.
" 48 "	.	.	.	.	.	.	.	.	.
" 60 "	†	.	.	.	.	.	.	.	.
" 72 "	.	.	.	.	.	†	.	†	†
" 84 "	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Une dose de ricine qui tue l'animal témoin en 52 heures tue en 36 heures du 4<sup>e</sup> au 8<sup>e</sup> jour (période anaphylactique).

## II. Ricine — Souris.

1 : 10 000 : 1 ccm + 36 heures, 0,5 ccm + 60 heures.

1. Injection anaphylactisante de 0,5 cc, 0,00001 à des souris le 30 X.   3 XI.   5 XI.   7 XI.   9 XI.   11 XI.   13 XI.   15 XI.   Contr.									
2. Réinj. sous-cutanée d'une dose de 0,5 cc de 1 : 10 000 mortelle en 60 <sup>h</sup> le 17 XI. c. à d. après									
	16	14	11	9	7	3	2	0 jour	
12 heures	.	.	.	.	.	.	.	.	.
24 "	.	.	.	.	.	.	.	.	.
36 "	.	.	.	.	.	.	.	.	.
48 "	†	.	.	.	.	†	†	.	.
60 "	.	†	†	†	†	.	.	.	†

## III. Ricine — Souris.

I. Injection anaphylactisante, à des souris très jeunes, de 0,000004   21 XI.   23 XI.   25 XI.   27 XI.   29 XI.   1. XII.						
2. Réinjection sous-cut. d'une dose 1/4 mortelle 0,00002 le 2 XII. c. à d. après						
	11	9	7	5	3	1
Constat. le 3. XII.	0	0	0	0	0	0
10. XII.	ass. maig.	ass. maig.	bien	très maig.	très maig.	maig.

Injections faites à de très jeunes souris; l'amaigrissement est maximum quand la réinjection est faite après 3—6 jours et peut dans ces conditions être considéré comme phénomène anaphylactique.

IV. Ricine—Lapin : injection sous-cut. suivie d'une instillation conjonctivale  
Dose mortelle 0,005 en 40 hs.; 0,01 en 24 hs.

Lapin 4	Lapin 5	Lapin 6	Lapin 7
Contrôle pas d'inj.	1. Injection anaphylactisante sous-cut. de 0,00005 le 31 X. soir   le 31 X. soir   le 31 X. matin		
2. Instillation à tous les lapins de 2 gouttes de ricine à 0,0005 1 XI.	c. à d. apr. 15 hs.   apr. 15 hs.   apr. 24 hs.		
Constat. le 2 XI. conjonctivite légère 4 XI. guéri	conjonctivite assez forte à peu près guéri	conjonctivite assez forte guéri	conjonctivite moyenne guéri
	anaphylaxie		début d'immunité
			33*



Lapin 8	Lapin 9	Lapin 10
Contrôle pas d'inj.	1. Inj. anaphylactisante sous-cut. de 0,00005 le 18 X.	le 18 X.
	2. Instillation de 2 gouttes de ricine à 00,01 le 21 X. c. à d. après 72 heures	
		après 84 heures
conjonctivite très forte	conjonctivite assez forte	conjonctivite assez forte <i>immunité</i>

V. Ricine—Lapin: instillation conjonctivale suivie d'une nouvelle  
instillation conjonctivale.

Dose mortelle 0,005 en 40 heures; 0,01 en 24 heures.

Lapin 11		
5 VIII. mat.	O D. Instillation de 1 goutte 0,000001 résultat: 0	O G.
6 VIII. mat.	Instillation de 1 goutte 0,00001 résultat: 0	
6 VIII. soir	Instillation de 1 goutte 0,0001 résultat: conjonctivite forte; <i>ana-</i> <i>phylaxie</i>	instillation de 1 goutte 0,0001 conjonctivite légère
9 VIII.		
11 VIII.	Instillation de 1 goutte 0,001 conjonctivite légère; <i>immunité</i>	

Lapin 12		
23 X. mat.	O Dr.	O G. Instillation de 1 goutte 0,0001 résultat: 0
23 X. soir	aux deux yeux instillation de 1 goutte 0,0001 O Dr. résultat: légère con- jonctivite	O G. résultat: 0 <i>immunité</i>

	Lapin 13	Lapin 14
31 X. soir	—	O G. Instillation anaphylactisante de 1 goutte 0,0005
1 XI. mat.	Contrôle instillation 1 goutte 0,0005 O Dr. résultat: con- jonctivite légère	c. à d. après 15 heures aux deux yeux instil- lation de 1 goutte 0,005 O Dr. résultat: con- jonctivite assez lé- gère
		O G. résultat: con- jonctivite notable- ment plus forte; <i>ana-</i> <i>phylaxie</i>

Ainsi chez le lapin :

Une instillation conjonctivale suivant une première injection sous-cutanée ou une première instillation conjonctivale donne une conjonctivite plus forte (anaphylaxie) que chez l'animal de contrôle, quand le délai entre les deux injections n'est que de 15 heures; au contraire, la conjonctivite est moindre que celle du contrôle, quand le délai entre les deux injections dépasse 24 heures (immunité).

Il est à remarquer qu'une instillation dans une des deux conjonctives anaphylactise nettement le côté intéressé, mais pas notablement le côté opposé. Römer<sup>1)</sup> a démontré qu'il en est de même pour l'immunité.

Il découle de cette série d'expériences que l'apparition de l'immunité contre les toxines est précédée d'une période d'anaphylaxie qui diffère d'après le poison employé et d'après l'espèce animale. La détermination de cette période d'hyper-sensibilité paraît devoir être utile pour la pratique de l'immunisation des animaux avec ces toxines.

Pour la ricine cette période anaphylactique dure 15 heures chez le lapin et une huitaine de jours chez la souris, or nous savons que chez le lapin la période d'incubation de la ricine est courte puisque l'animal succombe à une dose mortelle minima en 24 heures; au contraire la période d'incubation de la ricine chez la souris dure jusque 3 jours. Pour une même toxine, la période d'anaphylaxie est donc courte chez les animaux où la période d'incubation est courte elle est longue là où l'incubation est longue. La même différence s'observe pour le début de l'immunité: chez le lapin les instillations conjonctivales prudentes de ricine peuvent se suivre de jour à autre, tandis que l'on sait par les expériences classiques d'Ehrlich<sup>2)</sup> que l'immunité contre la ricine chez la souris apparaît pour ainsi dire brusquement vers le 6<sup>e</sup> jour.

Il y a entre ces trois facteurs: incubation, anaphylaxie et début de l'immunité une corrélation et une proportionnalité remarquables.

Ce rapport ressort facilement de nos expériences avec la ricine; il est confirmé par celles faites avec la toxine diphté-

1) Graefes Arch. f. Ophthalmologie, 1901.

2) Deutsche med. Wochenschr., 1901.

ritique: chez le cobaye la période d'incubation est de 3 à 4 jours, l'anaphylaxie dure 4 à 8 jours; d'autre part les expériences de Knorr rappelées plus haut montrent que chez le lapin où la période d'incubation est un peu plus courte, les injections quotidiennes sont mieux supportées que chez le cobaye, l'anaphylaxie est donc moindre. Il est difficile de compléter l'expérience par l'immunisation: il aurait dû suffire d'éviter l'écueil des injections répétées à de trop courts délais, c. à. d. pendant la période d'anaphylaxie. Cependant deux essais tentés en espaçant les injections successives de plusieurs jours n'ont pas été couronnés de succès, par suite des effets toxiques secondaires: paralysies, amaigrissement.

En conclusion de ses recherches sur l'anaphylaxie du chien à l'égard de la congestine Richet avait émis l'idée que pour ce poison, actif sans incubation, l'immunité avait pu s'établir parce qu'il y avait eu anaphylaxie.

Le travail qui précède constitue vraiment la démonstration de la conception de Richet et elle en étend la portée en montrant que pour une même toxine l'incubation, l'anaphylaxie et le début de l'immunité constituent trois facteurs liés intimement et qui varient simultanément d'après les espèces animales.

Nous avons vu dans les premières expériences relatées dans ce travail qu'à la 2<sup>e</sup> injection les phénomènes locaux tels que: l'œdème, la tuméfaction des ganglions voisins, sont différents de ceux que produit une même dose chez un animal neuf.

Nous nous contentons pour le moment d'appeler l'attention sur ces faits. Nous y reviendrons dans un travail ultérieur, où à la lumière de faits nouveaux nous serons conduits à une interpellation de l'anaphylaxie contre les toxines.

## Deuxième partie.

### Sur le rôle de la lécithine et de l'alexine dans la résorption des toxines.

Pour expliquer l'anaphylaxie, v. Pirquet<sup>1)</sup> considérait que la formation d'un anticorps, résultat d'une première in-

1) Die Serumkrankheit.

jection, modifiait la façon de réagir de l'organisme (allergie) lors d'une nouvelle injection : la combinaison brusque de l'anticorps et de l'antigène injecté provoquerait les symptômes toxiques.

Richet<sup>1)</sup> admet que la première injection développe une toxogénine laquelle à la seconde injection transforme l'antigène en apotoxine, cause des phénomènes anaphylactiques.

La toxogénine de Richet, correspond à l'anaphylactine de Rosenau et Anderson et de Gay et Southard.

Besredka<sup>2)</sup> complète en quelque sorte la théorie de Richet en y faisant intervenir le fait que le sérum chauffé peut encore sensibiliser un animal, mais ne provoque plus de symptômes graves chez l'animal sensibilisé.

Il admet dans le sérum la présence d'un sensibilinogène thermolabile et d'une antisensibilisine (toxogénine de Richet) qui se fixe dans l'organisme et surtout sur le système nerveux.

Le choc anaphylactique résulte de l'union de la sensibilisine et de l'antisensibilisine.

De Waele<sup>3)</sup> observa qu'à une première injection intrapéritonéale de sérum, l'arrivée des leucocytes est lente, et même au second jour le filtrat du liquide péritonéal, après précipitation des albumines, présente faiblement les réactions de Millon et du biuret (albumoses et peptones). Après une seconde injection l'arrivée des leucocytes, spécialement mononucléaires, est abondante et rapide. Le filtrat du liquide péritonéal, recueilli au moment des troubles anaphylactiques et encore à la 12<sup>e</sup> heure donne, nettement, après précipitation des albumines, les réactions de Millon et du biuret. Ce liquide péritonéal, renfermant des albumoses et des peptones, injecté à un animal neuf provoque des troubles anaphylactiques.

Une très faible attaque du sérum par de la pepsine avant l'injection favorise la production des phénomènes d'hyper-sensibilité; de même les produits de la séparation des divers albuminoïdes du sérum isolés par la méthode de Hofmeister sont plus actifs que le sérum lui-même.

1) Anh. Inst. Pasteur, T. 22, 1908, p. 465.

2) Ann. Inst. Pasteur, T. 22, 1908, p. 496.

3) Bull. Ac. Méd. Belgique, Nov. 1907.

L'auteur conclut qu'il est probable que les phénomènes d'anaphylaxie vis-à-vis du sérum ou de ses constituants albuminoïdes sont l'expression de la résorption des produits d'altération ou mieux de la digestion partielle de ces albumines et de leur assimilation à l'intervention des ferments leucocytaires; cette digestion devient plus rapide et plus intense à une seconde et une troisième injection.

L'auteur émit d'ailleurs le premier l'idée que les troubles anaphylactiques se rapprochent des symptômes que l'on observe d'emblée après l'injection de propeptone dans les veines d'un animal.

V a u g h a n <sup>1)</sup> rattache également les phénomènes d'hypersensibilité aux modifications subies par les substances protéiques.

Biedl et Kraus <sup>2)</sup> précisent ces considérations en montrant que chez les animaux en puissance de troubles anaphylactiques le sang est incoagulable et que la pression sanguine est diminuée, lesquels phénomènes sont caractéristiques pour les injections de peptones et d'albumoses.

Cette explication de l'anaphylaxie s'applique aux albumines et aux cellules, telles les hématies et les microbes: on conçoit que l'animal hypersensible soit capable de modifier ces éléments hétérogènes beaucoup plus rapidement que l'animal neuf; en un temps donné une plus grande somme d'albumine étrangère est rendue soluble dans l'eau et peut développer à ces doses des effets toxiques.

Mais cette explication traduit cependant son insuffisance puisque l'anaphylaxie existe aussi pour des produits déjà solubles dans l'eau avant leur injection; telles sont les substances employées par Richet, et comme nous venons de le voir les toxines microbiennes.

On sait d'autre part l'énorme importance que l'on a reconnue ces dernières années aux lipoïdes dans l'activité physico-chimique des cellules: le protoplasme vivant est imperméable aux solutions aqueuses, les éléments cellulaires et leurs parois

1) Proteinsensitization and its relation to some of the infectious diseases. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 1, 1909.

2) Biedl und Kraus, Experimentelle Studien über Anaphylaxie. Wiener klin. Wochenschr., 1909, No. 11.

sont constitués en partie de lipoïdes et les substances dissoutes dans l'eau et en même temps dans les lipoïdes ne pénètrent dans le protoplasme cellulaire que par la voie des lipoïdes; elles diffusent ainsi par cette voie jusqu'à équilibre de concentration.

Une première application de ces connaissances nouvelles est la théorie de la narcose, établie surtout par les travaux de H. Meyer et d'Overton.

Ces considérations générales sur les lipoïdes constituent la base de cette 2<sup>e</sup> partie de notre travail. Nous y avons conduit à reconnaître à ces substances un rôle primordial dans l'absorption et dans la circulation des toxines dans l'organisme.

Dans l'ignorance où nous sommes de la nature chimique de ces toxines nous avons étendu nos recherches à des corps toxiques nervins chimiquement mieux définis: les alcaloïdes. Ces expériences seront exposées dans un travail ultérieur.

#### Expériences avec la ricine.

A. Si l'on soumet une solution de ricine (dans la solution physiologique de NaCl) à l'action d'un exsudat leucocytaire (l. polynucléaires) pendant un ou plusieurs jours à 37° C (sous toluol) et qu'ensuite on sépare par centrifugation et par dialyse à travers la cellulose a) le sédiment leucocytaire, b) la partie liquide non dialysable et c) la partie liquide dialysable et qu'on les injecte séparément à des souris on constate que le liquide dialysable est inerte comme toxique au comme immunisant, et que le liquide non dialysable a perdu partiellement sa toxicité. Enfin le culot de centrifugation est très toxique, avec une très courte période d'incubation; il tue les souris en moins de 24 heures.

On sait que divers éléments cellulaires de l'organisme et en particulier les leucocytes peuvent absorber et fixer des quantités assez grandes de toxines. Aussi Metschnikoff<sup>1)</sup> mentionne que les exsudats leucocytaires, obtenus chez la poule injectée de toxine tétanique, sont plus toxiques que le sang.

Il est probable que dans ce cas comme dans celui de nos expériences avec la ricine il ne s'agit pas d'une simple concentration sous un moindre volume. Nous avons vu que

1) L'immunité dans les maladies infectieuses. Paris 1901.

la période d'incubation est raccourcie tandis que jamais l'injection sous cutanée des plus fortes doses de ricine chez la souris ne fait descendre le temps d'incubation en dessous de 30 heures. De même Meyer et Ransom<sup>1)</sup> ont constaté que la période d'incubation de la toxine tétanique ne diminue pas proportionnellement à la dose injectée.

B. Nous avons cherché ensuite si cette propriété de réduire le temps d'incubation en dessous de la limite habituelle était due aux leucocytes comme tels. Les expériences précédentes, où tous les leucocytes étaient morts, montrent qu'elle n'est pas liée à la vie de globules blancs.

Est-elle due aux ferments protéolytiques que l'on reconnaît aux leucocytes et sur lesquels Metchnikoff a tant insisté? Ou bien est-elle liée à d'autres parties constituantes de ces éléments cellulaires?

Dans les expériences suivantes nous avons soumis la ricine à l'action d'un ferment protéolytique déterminé: la trypsine; puis d'autre part nous avons essayé l'action du sérum et enfin celle d'un lipide, la lécithine, que l'on sait être un constituant important des leucocytes et sur l'importance de laquelle des expériences antérieures avaient tout spécialement attiré notre attention.

Le tableau ci-dessous résume ces expériences.

Ricine Merck 1%.

Lécithine Riedel à 1% en solution dans l'alcool méthylique, dont 1 cc en suspension dans 10 cc liq. physiologique.

Sérum du lapin frais et chauffé à 58°.

Trypsine Merck 1% dans liq. physiologique chloroformé.

A. Ricine 1%	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Liq. physiol.	0,5	0,25	0,25		0,25	
Lécith. $\frac{1}{1000}$		0,25		0,25		0,25
Sérum lap. frais			0,25	0,25		
Sérum lap. 58°					0,25	0,25
de chacun	dil. 1:10					
dont on injecte	0,5					
		† 39 hs.	† 36	† 36	† 24	† 30
	† 50 hs.					† 36

1) Arch. f. exp. Path., Bd. 49, 1903.

B. Ricine 1 %	1,5	1,5	1,5	1,5
Liq. physiol.	0,5	0,25	0,25	0,25
Lécith. $\frac{1}{1000}$		0,25		0,25
Trypsine $\frac{1}{100}$			0,25	0,25
de chacun dont on injecte	1,5 0,5			
	† 36 hs.	† 15	† 26	† 72
				† 84

De ce tableau il ressort nettement que la lécithine active l'intoxication par la ricine; le sérum frais du lapin exerce la même action, même avec plus d'intensité; au contraire le sérum chauffé est sans action mais il peut être réactivé par l'addition de lécithine.

La trypsine ne paraît pas activer la ricine, l'addition simultanée de trypsine et de lécithine amène un véritable retard dans l'action toxique; rapprochant ce résultat d'autres que nous avons rencontrés au cours de nos recherches nous savons qu'il faut interpréter ce fait comme l'expression d'une déviation de la lécithine par la trypsine.

Faut-il maintenant ne voir dans l'action activante des leucocytes et du sérum frais que l'intervention de lipoides?

Afin de mieux pouvoir varier les conditions d'expériences nous avons continué nos recherches avec la toxine diphtéritique employée chez le cobaye.

#### Expériences avec la toxine diphtéritique.

Nous disposions d'une toxine diphtéritique préparée fin 1905; à ce moment la dose mortelle minima était 0,006. Pendant le dernier tiers de l'année 1908 la dose mortelle était devenue 0,02 et celle-ci n'a pas varié pendant toute la durée de nos expériences comme on peut le voir par diverses expériences de contrôle mentionnées dans nos tableaux.

En général la toxine injectée était préparée par une dilution au  $\frac{1}{10}$  de façon que la dose toxique était renfermée dans 1 cc, ce afin de réaliser autant que possible l'égalité de concentration.



Les animaux (cobayes de 300—350 g) étaient élevés à l'institut et se trouvaient ainsi autant que possible dans des conditions identiques de vie et d'alimentation.

Nous avons commencé par répéter avec la toxine diphtérique les expériences faites avec la ricine. Il en résulte que l'exsudat n'active pas la toxine et que dans le mélange conservé plusieurs jours la toxine subit une désintoxication qui est peut-être bien due au séjour à 37°; cette désintoxication s'observe en effet parfois par la conservation de la toxine à 37° sans addition aucune. La toxine diphtérique est d'ailleurs moins stable que la ricine.

Nous arrivons ainsi à une partie plus intéressante de nos recherches: l'influence de la lécithine, du sérum frais, etc.

Ces expériences telles que nous les présentons demandent déjà un grand sacrifice d'animaux et on pourrait néanmoins objecter que les essais devraient être répétés un assez grand nombre de fois; cette critique ne peut être évitée qu'en entourant les expériences de contrôles variées et c'est surtout à ce point de vue que nous exposons nos recherches sous la forme des tableaux résumant les protocoles d'expériences. Il y est facile de se rendre compte combien elles servent de contrôle les unes aux autres et combien ces ensembles rencontrent l'objection formulée plus haut au point de ne pas rendre absolument indispensable la répétition fréquente de chacun des essais ou l'augmentation du nombre des animaux au dessus des réserves habituelles d'un laboratoire.

### Tableaux.

Tableau I.

Cobayes 300—350 g.

Toxine diphtérique E: dose mortelle minima 0,02 cc en 2 $\frac{1}{2}$  jours.

Lécithine Riedel, en solution à 1% dans l'alcool méthylique absolu, ou telle quelle, avec lesquelles on fait des suspensions dans le liq. physiologique.

Cob. 101	Inj. sous-cut. Tox. 0,02 cc + lécith. 0,25 cc à $\frac{1}{500} = 0,00005$	+ 60 <sup>a</sup>
„ 102	Tox. 0,02 cc + lécith. 0,25 cc à $\frac{1}{100} = 0,00025$	+ 36 <sup>a</sup>
„ 103	Tox. 0,02 cc + lécith. 0,25 cc à $\frac{1}{100}$ en partant de la sol. alc. = 0,0025	survie (act. de alcool sur la toxine?)
„ 104	Tox. 0,02 cc + lécith. 0,25 cc à $\frac{1}{100}$ en partant de la léc. telle quelle = 0,0025	+ 80 <sup>a</sup>

Tableau II.

Cobayes 300—350 g.

Toxine diphtéritique E: dose mortelle minima 0,02 cc en 2½ jours.

Lécithine Riedel à 1% dans l'alcool méthylique absolu dont 1 cc est mis en suspension dans 10 cc de liq. physiologique, 0,25 = d.

Sérum frais de lapin non chauffé et chauffé à 58°.

	A	B	C	D	E	F
Toxine	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc
Lécith. 1/1000		0,25		0,25		0,25
Sérum			0,25	0,25		
Sérum 58					0,25	0,25
Liq. phys.	0,50	0,25	0,25			
le tout dilué	0,3/10	0,3/10	0,3/10	0,3/10	0,3/10	0,3/10
donc 1 cc = dose mort. minima; de chaque solution 1 cc est injecté ss.-cut.						
	Cobaye 105	Cobaye 106	Cobaye 107, 108	Cobaye 109, 110	Cobaye 111, 112	Cobaye 113
12 <sup>h</sup>	.	.	.	.	.	.
24 <sup>h</sup>	.	.	.	.	.	.
36 <sup>h</sup>	.	†	† †	† 40	.	.
48 <sup>h</sup>	.	.	.	.	† 56	.
60 <sup>h</sup>	†	.	.	.	.	†

La solution D, conservée à 37°, est désintoxiquée après 18—20<sup>h</sup>.

Tableau III.

Cobayes 300—350 g.

Toxine diphtéritique E: dose mortelle minima 0,02 cc en 2½ jours.

Lécithine Riedel en solution à 1% dans l'alcool méthylique, dont 1 cc en suspension dans 10 cc liq. physiol.

Trypsine Merck en macération à 1% de l'eau chloroform.; filtrat clair.

Toxine	1 cc	1 cc	1 cc
Lécithin 1/1000	0,25		0,25
Lypsine 1%		0,25	0,25
Liq. physiol.	0,25	0,25	
le tout dilué 0,2/10 donc 1 cc contient 0,0133 toxine; 1 cc est injecté ss.-cut. à			
	Cobaye 114	Cobaye 115	Cobaye 116
	† 25	survie	survie

Tableau IV.

Cobayes 300—350 g.

Toxine diphtérique E: dose mortelle minima 0,02 cc en 2 $\frac{1}{2}$  jours.

Lécithine Riedel en solution à 1% dans alcool méthylique, dont 1 cc en suspension dans 10 cc liq. physiol.

16 XI. 16 <sup>a</sup> Toxine Lécithine	Cobaye 117 0,02 0,1 sous-cutanée	Cobaye 118    recoivent 0,02 0,1 dans carotide
	17 XI. 16 <sup>a</sup> + 29	nuit 17, 18 XI. < 34

Tableau V.

Cobayes 300—350 g.

Toxine diphtérique E.

Gluten caséine à 10% dans liq. physiologique. — Levure fraîche lavée et en suspension dans liq. physiol.

Lécithine Riedel à 1% dans alc. méthylique dont 1 cc en suspension dans 10 cc liq. physiol.

A. Injection dans le péritoine de 2 cc de gluten caséine à 10% à						
inject. de après 24 <sup>h</sup>	Cob. 119 tox. 0,02	Cob. 120 toxine 0,02 lécith. 0,25	Cob. 121 toxine 0,02 levure 1 oese	Cob. 122 toxine 0,02 levure 1 oese lécith. 0,25	Cob. 166 tox. 0,02	Cob. 167 tox. 0,02 lev. 1 oese
.	.	.	+ < 24	+ < 24	.	+ 32
.	+ 40	.	.	.	.	.
.	.	+ 45	.	.	+ 44	.
B. Injection sous-cutanée de 2 cc de gluten caséine à 10% à						
après 24 <sup>h</sup> inject. de	Cob. 123 tox. 0,02	Cob. 124 toxine 0,02 lécith. 0,25	Cob. 125 toxine 0,02 levure 1 oese	Cob. 126 toxine 0,02 levure 1 oese lécith. 0,25		
	+ 96	< 60	< 60	+ 64		

Tableau VI.

Cobayes 300—350 g.

Toxine diphtérique E: dose mortelle minima 0,02 cc en 2 $\frac{1}{2}$  jours.

Lécithine 1% dans alcool dont 1 cc en suspension dans liq. physiol.

On glisse sur la patte postérieure droite un anneau en caoutchouc qui crée en peu de temps ( $\frac{1}{2}$  à 1 heure) un œdème qui augmente encore.

Contrôle		Oedème surtout lymphatique		Oedème avec forte stase veineuse	
Cobaye 127 Inject. de tox. 0,02	Cob. 128 toxine 0,02 lécith. 0,25	Cob. 129 tox. 0,02	Cob. 130 toxine 0,02 lécith. 0,25	Cob. 131 tox. 0,02	Cob. 132 toxine 0,02 lécith. 0,25
.	† 27	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
.	.	† 45	† 45	† 45	† 45
. † 48	.	.	.	.	.

après 4 heures	Cobaye	133		† 66
” 8 ”	”	134		† 70
” 12 ”	”	135	† 62	
” 16 ”	”	136		† 120
” 24 ”	”	137		survie
” 24 ”	”	137 bis (tox. lécieth.)		survie

Cobaye 186	toxine	0,02		survie après 2 mois
" 187	"	0,02		" " 2 "
" 188	"	0,02 +	lécith. 0,25	" " 2 "
" 189	"	0,02 +	lécith. 0,25	" " 2 "
" 190	"	0,02 +	sérum frais 0,25	" " 2 "
" 191	"	0,02 +	sérum frais 0,25	" " 2 "

Bouillon peptoné à 5 % (injection du bouillon bien filtré clair).

Contrôle à 11 <sup>h</sup> dans péritoine				Injection du bouillon peptoné dans le péritoine, avant la toxine:							
				15 minutes				8 heures			
				à 11 <sup>h</sup> 10 2 cc dans pérít.		à 11 <sup>h</sup> 25 2 cc dans pérít.		à 11 <sup>h</sup> 20 2 cc dans pérít.		à 7 <sup>h</sup> 10 soir	
Cob. 138	Cob. 139	Cob. 140	Cob. 141	Cob. 142	Cob. 143	Cob. 144	Cob. 145	Cob. 146	Cob. 147	Cob. 148	Cob. 149
toxine 0,02		toxine 0,02 lécith. 0,05		toxine 0,02		toxine 0,02 lécith. 0,25		toxine 0,02		toxine 0,02 lécith. 0,25	
< 48	< 48	50		< 48	< 48	< 48		< 48	< 48	+ 50	
		survie					+ 56				+ 53

Tableau VIII.

Cobayes 300—350 g.

Toxine diphtérique E: dose mortelle minima 0,02 sous-cut. en 2 $\frac{1}{2}$  jours.

Lécithine Riedel en solution à 1 % dans l'alcool méthylique absolu dont 1 cc est mis en suspension dans 10 cc liq. physiologique.

Cobayes en partie anaphylactisés par une injection de 0,001 de toxine 4 jours resp. 7 jours auparavant.

Cobayes neufs				Cobayes anaphylactisés (4 jours)			
Cob. 150	Cob. 151	Cob. 152	Cob. 153	Cob. 154	Cob. 155	Cob. 156	Cob. 157
Inject. sous-cut. de		artérielle de		sous-cutan.		artérielle de	
tox. 0,02	tox. 0,02 + léc. 0,25	tox. 0,02	tox. 0,02 + léc. 0,25	tox. 0,02	tox. 0,02 + léc. 0,25	tox. 0,02	tox. 0,02 + léc. 0,25
.	.	.	+ 30	.	.	+ 31	+ 31
.	.	.	.	.	+ < 44	.	.
.	.	+ 48	.	+ 48	.	.	.
.	+ 56	.	.	.	.	.	.
Survie	.	.	.	.	.	.	.

Cobayes anaphylactisés (7 jours)			
Cob. 158	Cob. 158 bis	Cob. 159	Cob. 160
Inject. sous-cutan.		artérielle	
tox. 0,02	tox. 0,02 + léc. 0,25	tox. 0,02	tox. 0,02 + léc. 0,25
.	.	.	+ 30
.	.	+ 48	.
.	+ 54	.	.
+ 58	.	.	.

Tableau IX.

Cobayes 300—350 g.

Toxine diphtérique E: dose mortelle minima 0,02 sous-cut. en 2 $\frac{1}{2}$  jours.

Lécithine Riedel.

Levure fraîche lavée au liq. physiologique et en suspension dans liq. physiologique.

Contrôle Inj. sous- cut. tox. 0,02	Toxine 0,04 Levure 1 oese dans 0,6 liq. phys. 1 heure à 37° en inj. sous- cut.	Toxine 0,04 Levure 1 oese dans 0,6 liq. phys. 1 heure à 37° centrifugé, re- cueilli le liq. clair lequel est donné en inj. sous-cut.	Levure 1 oese dans 1 cc liq. phys. injecté sous-cut. 1 heure auparavant, puis au même endroit tox. 0,02 inj. sous-cut.	Levure 1 oese dans 1 cc liq. phys. injecté sous-cut. 1 heure auparavant, puis au même endroit inj. sous-cut. tox. 0,02 léc. 0,25
Cob. 161	Cob. 162	Cob. 163	Cob. 164	Cob. 165
.	.	.	.	.
+ 50	.	.	+ 48	.
.	.	.	.	.
.	.	+ 60	.	+ 56
.	Survie	.	.	.

Tableau X.

Cobayes 300—350 g.

Toxine diphtéritique E: dose mortelle minima 0,02 sous-cut. en 2 $\frac{1}{2}$  jours.

Thyroidine Merck en poudre (dose 0,15 par cobaye, sous-cut. en suspension dans liq. physiologique) injectée 16 heures auparavant.

Lécithine Riedel.

Inj. sous-cutanée		Inj. intrapéritonéale	
Cobaye 168 toxine 0,02	Cobaye 169 toxine 0,02 lécithine 0,25	Cobaye 170 toxine 0,02	Cobaye 171 toxine 0,02 lécithine 0,25
† 27	† < 44	† 27	† < 44

Tableau XI.

Cobayes 300—350 g.

Sérum antithyroïdien.

Toxine diphtéritique E.

Lécithine Riedel.

Cobaye 172 Contrôle	Cobaye 173 toxine 0,02 + sér. antithyr. 0,25	Cobaye 174 toxine 0,02 + sér. antithyr. 58°	Cobaye 175 toxine 0,02 sér. antithyr. 58° lécithine
† 60	grd. œdème † < 60	† 62	† 65

Le sérum antithyroïdien est injecté à la dose de 2 cc une demie heure avant la toxine aux.

Cobaye 176	Cobaye 177	Cobaye 178	Cobaye 179
Injection péritonéale		Injection sous-cutanée	
toxine 0,02	toxine 0,02 lécithine 0,25	toxine 0,02	toxine 0,02 lécithine 0,25
† 40	† < 36	† < 60	† 75

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. III.

34

Tableau XII.

Cobayes 300—350 g. Antithyroïdine Merk.  
 Toxine diphtéritique E. Sérum antithyroïdien.  
 Lécithine Riedel.

Inj. intracérébr.			Inject. 0,15 thy. sous-cut. 16 <sup>h</sup> auparavant		
tox. 0,02	tox. 0,02 léc. 0,25	tox. 0,02 sér. antithyr. 0,2	tox. 0,02	tox. 0,02 léc. 0,25	tox. 0,02 sér. anti- thyr.
Cob. 180	Cob. 181	Cob. 182	Cob. 183	Cob. 184	Cob. 185
.	† 17	.	.	† 18 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	.
.	.	.	† < 38	.	.
† 40	.	.	.	.	.
.	.	† 41 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	.	.	.
.	.	.	.	.	† 43

Tableau XIII.

Toxine 0,02.  
 Lécithine Riedel.  
 Levure fraîche.

## A. Cobayes 350 g.

toxine 0,02	toxine 0,02 sérum frais 0,25	toxine 0,02 sérum frais 0,25 levure	toxine 0,02 lécithine 0,25	toxine 0,02 lécithine 0,25 levure
Cob. 192	Cob. 193	Cob. 194	Cob. 195	Cob. 196
.	† < 48	.	† < 48	.
† < 96	.	† < 72	.	† < 72

## B. Cobayes 200 g

toxine 0,02 sérum frais	toxine 0,02 sérum frais 0,25 levure	Sérum frais + levure 2 <sup>h</sup> à 25° puis centrifugé
		toxine 0,02 sérum frais 0,25 centrifugé clair après extraction par levure
Cobaye 197	Cobaye 198	Cobaye 199
† < 48	† < 72	† < 48

A. Après avoir déterminé dans un premier essai la dose de lécithine la plus favorable (tabl. I), les expériences du tableau II montrent que de petites quantités de lécithine activent la toxine diphtérique, tout comme elle le fait pour la ricine.

Au contraire de grandes quantités de lécithine ont un effet retardant\*). L'addition de sérum frais agit également favorablement. Si l'on chauffe le sérum à 58°, l'action adjuvante tend à disparaître et ne paraît pas être complétée à nouveau par l'addition de lécithine.

L'addition de trypsine au mélange détruit la toxine.

Ces résultats sont valables pour l'injection sous-cutanée tableau I et II, pour l'injection artérielle (tabl. IV, VIII) et pour l'injection intracérébrale (tabl. XII), de la toxine.

La lécithine a une action retardante si la toxine est injectée dans le péritoine.

B. Si l'on crée à l'endroit d'injection, un exsudat leucocytaire, par l'injection préalable de gluten caséine p. ex., la même différence se maintient: la lécithine active la toxine injectée sous la peau, retarde son action quand elle est introduite dans le péritoine (tabl. V). La présence des leucocytes en trop grand nombre ne paraît donc pas intervenir favorablement; les globules ou leurs dérivés paraissent absorber la lécithine.

C. Si l'on produit au contraire un œdème séreux en appliquant p. ex. un lien sur la base d'un membre et que l'on injecte la toxine avec un sans lécithine dans cet exsudat, on n'observe aucune modification appréciable du délai de la mort, si on enlève de lien quelques minutes après l'injection (tabl. VI).

Si au contraire on enlève le lien après divers intervalles, on voit que cet œdème maintenu pendant 12 heures

---

\*) Déjà Kempner et Schepilewsky<sup>1)</sup> avaient complété les expériences connues de Wassermann et Takaki<sup>2)</sup> en montrant que non seulement de la matière cérébrale triturée avec la toxine tétanique empêchent l'empoisonnement, mais que la lécithine, la cholestérine et même des graisses telles l'huile d'olive annihilent l'action de la toxine.

1) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 27, 1898.

2) Berl. klin. Wochenschr., 1898.



a peu d'influence; s'il est maintenu une quinzaine d'heures l'animal survit longtemps et si l'œdème est gardé plus longtemps encore l'animal est sauvé même si l'on fait intervenir de la lécithine (tabl. VI).

Nous touchons ici à une question d'actualité pratique, l'application de la stase au point de vue thérapeutique d'après Bier<sup>1)</sup>. Cette méthode a provoqué une série de recherches théoriques sur l'influence de la stase dans l'inflammation par inoculations microbiennes, dans l'intoxication par les alcaloïdes, dans l'intoxication par les toxines. Ce dernier point fut étudié par v. Graff<sup>2)</sup>. Cet auteur admet que la stase n'agit qu'en retardant l'absorption; tous ses animaux injectés de toxine diphtérique ou tétanique finissent par succomber avec des retards variables. L'auteur ne dit pas si, dans ses essais, la stase fut intermittente comme le recommande Bier, et ne définit pas la dose de toxine injectée<sup>3)</sup>.

Les résultats de nos expériences (tabl. VIC) dans lesquelles la stase fut interrompue pendant 48 heures, complètent ceux de v. Graff. Tous nos animaux, qui d'ailleurs ne recevaient qu'une dose mortelle, survivaient encore deux mois après l'expérience. La toxine est donc ou fixée ou détruite par les tissus environnants.

D. En injectant dans le péritoine du bouillon ordinaire, on provoque une phagolyse et comme corollaire une augmentation de la quantité d'alexine en présence.

Cette phagolyse débute déjà 5 minutes après l'injection et dure plusieurs heures [Metchnikoff<sup>3)</sup>].

En injectant alors la toxine 15 minutes après le bouillon, on arrive au moment où existe déjà la phagolyse.

Ces circonstances favorisent notablement l'action de la toxine; l'addition de lécithine en supplément a un effet retardant.

Si l'on injecte la toxine 3 heures après le bouillon, on observe encore les mêmes phénomènes (tabl. VII).

E. L'état d'anaphylaxie fait succomber les animaux plus vite qu'à l'état normal, surtout quand il s'agit d'injections

1) Hyperämie als Heilmittel, 1907.

2) Münch. med. Wochenschr., 1908, p. 277.

3) L'immunité, 1901, Chap. 8.

sous-cutanées (tabl. VIII). L'action favorisante de la lécithine pour les injections sous-cutanées et artérielles reste manifeste (Tabl. VIII).

F. Il est acquis par les travaux de M. Fassin<sup>1)</sup> que l'injection de thyroïdine aux animaux augmente la teneur de leur sérum en alexine pendant 2 jours environ. Si entretemps nous injectons la toxine, nous constatons que la toxine agit plus vite qu'à l'état normal et la différence normale en faveur de l'injection intrapéritonéale disparaît (tabl. X, XII).

L'addition de lécithine a un effet retardant (tabl. X) sauf pour l'injection intracérébrale (tabl. XII).

L'injection intracérébrale de toxine additionnée de lécithine chez un animal traité à la thyroïdine réalise le délai d'intoxication, le plus court que nous ayons observé.

G. L'addition de sérum d'un animal thyroïdectomé faite directement à la toxine n'a pas d'effet manifeste (tabl. XI). L'injection préalable des quantités plus grandes du même sérum aux animaux ne paraît pas modifier les effets de la toxine seule; mais elle paraît renverser le rôle de la lécithine y ajoutée: de favorable elle devient retardante dans le cas d'une injection sous-cutanée, de retardante elle devient favorable dans l'injection intrapéritonéale (tabl. XI).

H. On sait que la levure a la propriété d'absorber l'alexine des sérums, d'autre part une expérience préalable montre qu'elle n'absorbe pas la toxine (tabl. V). Elle renferme d'autre part beaucoup de lécithines, détériorée, elle peut donc en céder et modifier le beneur du milieu ambiant en lepoïdes.

L'addition de levure à la toxine au moment de injection dans un exsudat leucocytaire supprime ou atténue fortement l'action retardante de la lécithine (tabl. V, IX).

La levure injectée en même temps que le sérum manifeste une action retardante. Mais du sérum additionné de levure et débarrassé ensuite de celle-ci par centrifugation n'a pas perdu son action favorisante à l'égard de la toxine (tabl. XIII).

Cette action retardante sur les mélanges de toxine et de lécithine est le plus manifeste dans l'injection sous-cutanée de toxine et de levure (tabl. V, XIII); elle n'existe plus quand

1) C. R. Soc. Biolog., Paris, T. 62, 1908.

on a préalablement produit un appel considérable de leucocytes à l'endroit d'injection, soit sous la peau, soit dans le péritoine (tabl. V).

Quoique l'on puisse désirer comme nous l'avons dit en commençant, voir répéter ces expériences sur un nombre encore plus grand d'animaux, il ressort ce pendant de toute la série d'expériences considérées dans leur ensemble, des conclusions qui peuvent se formuler ainsi:

a) Dans toutes les conditions d'expériences où soit à l'endroit d'injection soit dans l'organisme entier, la quantité d'alexine est augmentée, l'action de la toxine se trouve renforcée en quantité et en rapidité.

b) Là où l'alexine est rare ou fait défaut, la lécithine (d'oeuf) peut jusqu'à un certain point prendre elle-même ce rôle favorisant.

c) Au contraire là où la lécithine (d'oeuf) est présente en grande quantité ou se rencontre avec une grande quantité d'alexine, elle a une action retardante.

De quelle nature est cette propriété favorisante de la lécithine?

En premier lieu il s'agit de savoir si les toxines ne sont pas transformées à l'état de lécithide avant leur résorption, et si ce n'est pas sous cette forme qu'elles circulent dans l'organisme.

Nous avons essayé de préparer des lécithides avec la ricine et avec la toxine diphtéritique en suivant le procédé indiqué par Keyes<sup>1)</sup> et qui consiste à agiter la toxine avec une solution chloroformique de lécithine et à précipiter la lécithide produite par l'éther; cette méthode avait conduit cet auteur à la découverte des lécithides de venins. Remarquons cependant que les expériences de Keyes se rapportent exclusivement aux propriétés hémolytiques du venin de Cobra et pas à leurs propriétés toxiques.

Même à dose élevée, correspondant par exemple à 1 cc de la toxine diphtéritique originale, le produit supposé être

1) Berliner klin. Wochenschr., 1903.

la lécithide en question n'a aucune action sur le cobaye; on obtient des résultats identiques avec la ricine.

En présence de cette constatation négative on pourrait être tenté de se demander si la lécithine n'intervient pas comme facteur favorisant à côté d'un autre facteur „ambocepteur“ capable d'amener une modification de la toxine. Mais nous avons renoncé à vérifier cette hypothèse, en présence des résultats concordants obtenus dans des expériences faites avec divers alcaloïdes et qui démontrent que l'intervention de la lécithine dépend simplement de la propriété que présentent les lipoïdes de constituer des dissolvants pour certaines substances solubles à la fois dans l'eau et dans les lipoïdes. Ces expériences qui font le sujet d'un travail ultérieur montrent que c'est par l'intermédiaire des lipoïdes que ces substances pénètrent dans le protoplasme vivant.

#### Zusammenfassung.

1) Zwischen Inkubation, Anaphylaxie und Beginn der Immunität bestehen für Gifte (Diphtherietoxin, Ricin) bestimmte Beziehungen, die je nach dem Gift und der Tier-species verschieden sind.

2) Die Anaphylaxie geht der Immunität voraus.

3) Die Wirkung eines Toxins nimmt proportional mit der Komplementmenge zu.

4) Dem Lecithin kommt bis zu einem gewissen Grade die gleiche giftverstärkende Fähigkeit zu; es spielt dabei die Rolle eines Lösungsmittels für das Toxin.

5) Im Ueberschuß hemmt das Lecithin die Wirkung des Toxins.

(F.)

*Nachdruck verboten.*

[Travail du Laboratoire d'Hygiène et de Bactériologie de l'Université de Gand.]

### Du rôle des lécithines dans l'absorption et l'action des alcaloïdes.

Par le Dr. Henri De Waele (Gand).

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. August 1909.)

Nous avons montré l'importance de l'intervention de lécithine dans l'absorption des toxine microbiennes. Il s'agissait dans l'espèce de substances solubles dans l'eau et agissant surtout sur les éléments nerveux.

Mais l'ignorance absolue où nous sommes de la nature chimique de ces toxines nous a engagé à étendre nos recherches à des corps chimiquement mieux définis et d'action quelque peu analogue: les alcaloïdes.

Nous nous sommes servi d'alcaloïdes (Merck) dissous dans l'eau. La lécithine d'œuf (Merck) a été employée telle qu'elle, non dissoute dans l'éther ou l'alcool pour éviter l'introduction d'un nouveau facteur; la solution d'alcaloïde et la lécithine étaient broyées au mortier jusqu'à suspension parfaite, et laissés ainsi en contact pendant une ou deux heures avant leur injection.

Nous résumons nos expériences dans les tableaux suivants.

Lapins de 1500 g

Injection intracérébrale de Coniine Merck en solution aqueuse à 1 ‰

Lécithine Merck.

Coniine 0,01	Coniine 0,01	Coniine 0,012
20 min. légère parésie	14 min. tremblement sur	14 min. tremblement sur
30 min. affaissement	excitation	excitation affaissement
40 min. affaissement lé-	25 min. id.	légère
gère dyspnée	35 min. id.	dyspnée
5 hs. †	survie	20 min. id.
		30 min. id.
		mieux
		survie

Coniine 0,01 + lécithine 0,005	Coniine 0,01 + lécithine 0,005	Coniine 0,012 + lécithine 0,005
2 min. parésie; agitation 3 min. tremblement 7 min. parésie; forte dyspnée 15 min. forte dyspnée 20 min. parésie avec tremblement 30 min. id.; dyspnée 6 hs. † <i>incubation raccourcie</i>	1 min. dyspnée 3 min. tremblement; agitation 5 min. parésie attendant avec tremblement 7 min. quelques convulsions 9 min. † <i>incubation raccourcie</i>	1 min. dyspnée 2 min. tremblement; agitation convulsive 4 min. parésie avec tremblement 7 min. agitation convulsive 8 min. † <i>incubation raccourcie</i>
Coniine 0,01 + lécithine 0,25		
10 sec. paralysie 5 min. un peu mieux 10 min. mieux 12 min. encore mieux 17 min. bien 4 hs. † <i>action immédiate, atténuée ensuite</i>		

Strychine, solubilité dans l'eau 1:7000

Lapin 2 kilos

Inj. sous-cutanée 10 cc = 0,00143	Inj. sous-cutanée 10 cc = 0,00143 + lécithine 0,02
20 min. forte excitabilité réflexe 22 min. tétanos 30 min. paralysie; tétanos 60 min. mourant 120 min. †	30 min. excitabilité réflexe 40 min. tétanos 60 min. paralysie 30 hs. † atténuation

Brucine, solution à 1 % dans l'alcool éthylique à 32°

Lapins de 2—2,5 kilos

Inj. sous-cutanée 0,01	Inj. sous-cutanée 0,08
40 min. légère excitabilité	20 min. parésie 30 min. excitabilité
Inj. sous-cutanée 0,01 + lécithine 0,01	Inj. sous-cutanée 0,08 + lécithine 0,3
40 min. excitabilité réflexe marquée action favorisante	rien désintoxication

Coniine Merck, solubilité dans l'eau 1:200  
Cobayes de 400 g

Inj. sous-cutanée 0,03	
20 min. paralysie; dyspnée 23 min. convulsions; †	
Inj. sous-cutanée 0,03 + lécithine 0,1	Inj. sous-cutanée 0,03 + lécithine 0,35
10 min. dyspnée 12 min. paralysie débutante 20 min. paralysie 25 min. † incubation raccourcie	rien    désintoxication

Sulfate de strychnine, solubilité dans l'eau 1:10  
Lapins de 2 kilos

Inj. sous-cutanée 0,0015	Inj. sous-cutanée 0,0015 + lécithine 0,035
20 min. raideurs 30 min. forte excitabilité réflexe 40 min. tétanos survie	rien   désintoxication

Chlorhydrate de cocaïne, solubilité dans l'eau 1:2  
Cobaye de 400 g

Inj. sous-cutanée 0,012	0,02		
8 min. malade 20 min. très mal 25 min. un peu mieux survie	8 min. †		
Inj. sous-cutanée 0,012 + lécith. 0,002	0,02 + lécith. 0,002	0,02 + lécith. 0,025	0,02 + lécith. 0,4
10 min. hocquet mou 12 min. malade 20 min. se remet survie	7 min. malade 10 min. spasmes 14 min. mou 20 min. †	20 min. début ma- ladie 35 min. mal survie atténuation et retard	rien   désintoxication
Inj. intra- péritonéale 0,02	0,02 + lécith. 0,015		0,02 + lécith. 0,3
30 min. légère dys- pnée  survie	15 min. agitation 20 min. délire 1 hs. id. survie action favori- sante		rien   désintoxication

Sulfate de strychnine Lapins de 2 kilos	
Injection intrapéritonéale 0,002	
20 min. légère exagération réflexe	
30 min. id.	
1 heure 30 min. id.	
survie	
0,002 + lécithine 0,01	
14 min. tétanos	
16 min. †	
action favorisante	
0,02 + lécithine 0,15	
rien	
survie	
désintoxication	

Les résultats de nos expériences démontrent l'importance énorme de l'intervention des lécithines dans l'absorption des alcaloïdes; ils peuvent s'exprimer ainsi:

1) Une très petite quantité de lécithine favorise l'action des sels d'alcaloïdes; l'addition d'une quantité à peu près équimoléculaire de lécithine à un sel d'alcaloïde se traduit par un retard et un affaiblissement dans l'action toxique.

2) L'addition d'une quantité multiple de la quantité équimoléculaire annihile l'action du sel l'alcaloïdique.

3) L'addition de lécithine en petite quantité et même en quantité équimoléculaire favorise l'action de l'alcaloïde basique en solution.

4) L'addition de lécithine en quantité multiple de la quantité équimoléculaire annihile l'action de l'alcaloïde basique.

5) L'action favorisante et la désintoxication s'observent pour des injections sous cutanées, intraveineuses ou intrapéritonéales; nous verrons plus loin lorsqu'elles ne se produisent pas si le mélange est donné per os.

Comment faut-il interpréter ces résultats?

La première idée qui se présente à l'esprit est celle d'une combinaison chimique insoluble ou non toxique.



Cependant déjà le fait qu'il faut des quantités de lécithine multiples des quantités équimoléculaires apporte le doute; à moins que la lécithine n'agisse que par ses produits de dédoublements, or des expériences nous ont montré que l'oléine ni la choline n'interviennent.

Ces combinaisons devraient être d'autre part très instables puisque l'introduction des mélanges de lécithine et de sulfate de strychnine (p. ex. en doses correspondantes à 5 doses mortelles d'une part et en quantité décuple de la quantité équimoléculaire d'autre part) soit per os, soit directement dans l'intestin après laparotomie, tue l'animal après un délai de 1 à 2 heures (per os) et 4—5 minutes (par injection dans l'intestin).

L'introduction de sulfate de strychnine aux mêmes doses, sans addition de lécithine a exactement le même effet.

Une combinaison hypothétique devrait donc être facilement détruite, à moins d'admettre, ce qui est plus probable que dans l'estomac et dans l'intestin le sulfate de strychnine est absorbé beaucoup plus rapidement que la lécithine.

Les alcaloïdes et leurs sels sont solubles dans les lipoïdes et cette solubilité a une importance capitale; il est connu que l'on n'augmente pas la vitesse d'action d'un alcaloïde en augmentant sa solubilité dans l'eau p. ex. en le transformant en sel. Pour qu'un renforcement et une accélération de la toxicité, tels que nous les avons décrites plus haut, soient possibles, il faut que l'alcaloïde soit amené au cerveau sous une forme plus assimilable que la solution aqueuse, telle que serait une dissolution dans un lipoïde.

Pour établir ce fait il suffit de réaliser le contact immédiat de la substance nerveuse avec les solutions, par ex. par des injections intracérébrales; mais peu d'alcaloïdes conviennent à ce genre d'expériences à cause de leur faible solubilité et du grand volume qu'il faudrait injecter.

Dans les expériences énumérées nous nous sommes servi de la conifine Merck en solution à 1% dans l'eau. On l'injecte intracérébralement, en utilisant seulement les animaux chez lesquels la perforation crânienne et l'intro-

duction préalable de l'aiguille n'ont pas provoqué d'hémorragie appréciable.

Un alcaloïde déjà dissout dans un lipoïde se fixe donc plus vite sur les lipoïdes de la substance cérébrale et probablement aussi sur les lipoïdes d'autres tissus; et c'est la connaissance de cette solubilité qui nous fournira l'interprétation des phénomènes que nous avons décrits et en somme du mode d'absorption des alcaloïdes.

On a beaucoup étudié dans ces derniers temps le rôle des lipoïdes dans l'activité physico-chimique des cellules. Un des premiers résultats de ces recherches a été une théorie de la narcose telle que l'ont formulée Overton et H. Meyer.

Une série d'autres recherches ont montré que le protoplasme vivant est imperméable aux solutions aqueuses. Les cellules et leurs parois sont constituées en partie de lipoïdes. Les substances dissoutes dans l'eau et qui en même temps sont solubles dans les lipoïdes ne pénètrent dans le protoplasme cellulaire que par la voie des lipoïdes et diffusent ainsi par cette voie jusqu'à équilibre de concentration<sup>1)</sup>.

En appliquant maintenant ces données aux faits qui nous occupent, on peut concevoir l'absorption des alcaloïdes d'après le mécanisme suivant:

Une fois la solution aqueuse d'alcaloïde injectée il se fait un partage: une partie de l'alcaloïde se dissout dans les lipoïdes des cellules environnantes; s'étendant ainsi de proche en proche, le rapport des masses entre l'eau et les tissus ambiants est tel que bientôt il ne reste plus que fort peu d'alcaloïde dissout dans l'eau.

De proche en proche, par la voie des lipoïdes tissulaires, l'alcaloïde arrive aux cellules nerveuses sensibles où il se fixe d'une façon plus ferme et aussi s'y concentre peu à peu.

---

1) On a établi au point de vue du mode d'absorption et du mode d'action une différence essentielle entre les substances solubles dans les lipoïdes et celles qui y sont insolubles. Ces dernières peuvent agir par leurs ions sur l'état colloïdal de la lécithine et c'est probablement à l'intervention des ions acides que l'on doit les différences d'action entre les alcaloïdes et leurs sels, injectés avec peu de lécithine.

Dès que la dose fixée est devenue suffisante, les phénomènes d'intoxication éclosent.

Cette progression relativement lente de la diffusion par la voie des lipoïdes des tissus correspond au délai d'incubation.

L'adjonction d'une petite quantité de lécithine à l'eau au moment de l'injection facilite d'après nos expériences l'absorption par les lipoïdes cellulaires. Au contraire par l'addition d'une grande quantité de lécithine, le coefficient de partage de l'alcaloïde entre la lécithine introduite et les lipoïdes tissulaires est au désavantage de ces derniers: de là l'action désintoxicante obtenue par des fortes quantités de lécithine.

Remarquons que l'addition de lécithine a les mêmes effets par la voie artérielle que par d'autres. L'injection intra-artérielle ne conduit pas l'alcaloïde directement au cerveau: il y a partage de l'alcaloïde entre les lipoïdes des cellules ambiantes et surtout des leucocytes. A l'instigation de Metchnikoff et à l'appui de la théorie de la phagocytose, Calmette ainsi que Lombard ont trouvé que si on injecte du sulfate d'atropine dans le sang de lapins une partie notable est absorbée et fixée par les leucocytes (il est d'ailleurs établi que les poisons injectés dans le sang en disparaissent en majeure partie en peu de minutes). Les hématies et le plasma avaient aussi fixé une partie de l'atropine, mais dans la préoccupation d'étayer l'importance des leucocytes on négligea un peu les autres éléments, tandis que notre interprétation des faits y attache la plus grande valeur.

L'intervention des lipoïdes est donc prépondérante dans l'absorption, la diffusion bref la circulation des alcaloïdes.

Cette progression de proche en proche par la voie des lipoïdes des éléments en majorité fixes explique très bien la période d'incubation.

Les différences dans la solubilité des divers alcaloïdes dans la lécithine aurait donc une valeur importante qui serait calculable, si le problème ne se compliquait du fait de la

coexistence d'autres lipoïdes et corps gras, tels la cholestérine etc. qui interviennent chacune par leur pouvoir dissolvant.

Pour un même alcaloïde et pour un animal sain la plupart de ces facteurs sont constants, de là la constance de la dose toxique, et la variabilité de celle-ci dans les conditions expérimentales anormales.

### Zusammenfassung.

Geringe Dosen von Lecithin begünstigen, große Dosen hemmen die Wirkung der Alkaloide. Das Lecithin hat dabei, wie bei der Alkaloidvergiftung überhaupt, die Funktion eines Lösungsmittels.

(F.)

### Littérature.

- Meyer, H., Zur Theorie der Alkoholnarkose. Arch. f. experim. Path., Bd. 42, 1899; Bd. 46, 1901.  
— Dasselbe. Sitzungsber. Marburg, 1899.  
Pohl, Ueber Aufnahme und Verteilung des Chloroforms im tierischen Organismus. Arch. f. experim. Pathol., 1891.  
Nicloux et Frison, C. R. Soc. Biologie, T. 62, 1907.  
Blumenthal und Jacoby, Biochem. Zeitschr., Bd. 7, 1907.  
Overton, Studien über die Narkose, Jena 1901.  
— Arch. f. d. gesamte Physiol., 106, 1905.  
Höber, Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe, Leipzig 1902.  
— Arch. f. die gesamte Phys., 105, 1904.  
Porges und Neubauer, Physikalisch-chemische Untersuchungen über das Lecithin und das Cholesterin. Biochem. Zeitschr., Bd. 7, 1907.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der Abteilung für experimentelle Therapie des Eppendorfer Krankenhauses, Hamburg (Oberarzt: Dr. Much).]

### **Ueber die Sternsche Modifikation der Wassermannschen Reaktion.**

Von Dr. **Hans Kleinschmidt.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. September 1909.)

Jeder, der viel Gelegenheit hat, die Wassermannsche Reaktion zu praktischen Zwecken auszuführen, wird die Mitteilung von M. Stern<sup>1)</sup> mit Freuden begrüßt haben, nach der es gelungen sein sollte, durch eine Aenderung der Technik nicht nur eine Vereinfachung der Reaktion, sondern auch eine bedeutende Verfeinerung zu erzielen. Das Wesen dieser Modifikation besteht in der Benutzung des im menschlichen Serum vorhandenen natürlichen Komplementes an Stelle des Meer-schweinchenserums. Ihre Brauchbarkeit wurde bestätigt von Meirowsky<sup>2)</sup>, sowie Schlimpert und Voswinkel<sup>3) 4)</sup>. Immerhin empfehlen sie ihre Anwendung nur neben der ursprünglichen Methode wegen der Gefahr nicht-spezifischer Hemmungen.

Ich habe nun in den letzten Wochen systematisch alle zur Anstellung der Wassermannschen Reaktion dem Institut überwiesenen Sera nach der ursprünglichen Methode und gleichzeitig der Sternschen Modifikation geprüft und kam gleich zu Anfang meiner Untersuchungen zu einem Resultat, das nicht mit den Angaben von M. Stern in Einklang zu bringen war. Es zeigte sich nämlich keine Verschärfung der Reaktion, sondern im Gegenteil, es traten weniger Hemmungen

---

1) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therapie, Bd. 1, 1909, Heft 3.

2) Berl. klin. Wochenschr., 1909, No. 28.

3) Münch. med. Wochenschr., 1909, No. 29.

4) Deutsche med. Wochenschr., 1909, No. 32.

ein als bei der ursprünglichen Methode. Selbstverständlich suchte ich zunächst den Fehler in der von mir angewandten Technik, aber ich konnte nur feststellen, daß sie genau mit den Sternschen Angaben übereinstimmte ( $\frac{1}{5}$  und  $\frac{2}{5}$  des alkoholischen Leberextraktes, dreifache Menge des vorher aus- titrierten Ambozeptors, 2,5 Proz. Hammelblutkörperchen)<sup>1)</sup>. Ich kann um so weniger hierin die Ursache meines Unter- suchungsergebnisses finden, als ich stets frische (gewöhnlich 24-stündige, selten 48-stündige) Sera benutzte und im übrigen jedesmal die gleichen Blutkörperchen, den gleichen Extrakt und Ambozeptor wie bei der Wassermannschen Reaktion in entsprechenden Verdünnungen verwandte. Die Extrakte wurden immer in der gleichen Weise verdünnt, so daß ein Einfluß verschieden schneller Verdünnung, wie ihn Sachs und Rondoni<sup>2)</sup> beschrieben haben, nicht möglich war. Das Ergebnis blieb bei jeder Serie der untersuchten 200 Fälle das gleiche: ein oder mehrere Sera gaben absolute Lösung, die nach Wassermann Hemmung zeigten, seltener war das umgekehrte Verhalten festzustellen. Die Unterschiede waren von vornherein so auffallend, daß auch nicht Irrtümer, be- ruhend auf mehr oder weniger starker Nachlösung und da- durch verursachtem falschen Ablesen, herangezogen werden können.

Bei 10 Seren, also in 5 Proz. aller untersuchten Fälle, konnte eine Entscheidung nicht getroffen werden, da das Komplement entweder ganz fehlte oder in so geringer Menge vorhanden war, daß eine Lösung der Kontrollen ausblieb. Wenn es auch keinem Zweifel unterliegt, daß in der Regel frisches Serum genügend Komplement enthält, so möchte ich doch nicht unerwähnt lassen, daß gelegentlich bei einem nicht- kachektischen Patienten auch das unmittelbar vor Anstellung der Reaktion abgenommene Blut Komplementmangel aufwies, und daß meine Sera selten älter als 24 Stunden waren. Bei 165 Fällen stimmte das Resultat beider Methoden überein, die übrigen verteilen sich, wie folgt:

1) Genaueres über die Technik ist in der Originalarbeit nachzulesen.

2) Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 44.

Wassermannsche Reaktion positiv.	Sternsche Modifikation negativ.
1) Einseitig fehlender Patellar- und Achillessehnenreflex	9) Lues cerebro-spinalis
2) Tabes	10) Latente, aber sichere Syphilis
3) Luetische Knochenerkrankung	11) Tabes
4) Angina specifica	12) Lues III
5) Tabes	13) Tabes
6) Lues cerebri	14) Periostitis der Tibia
7) Paralyse	15) Paralyse
8) Juvenile Tabes	16) Demenz, Nystagmus.

Wie schon aus der Tabelle hervorgeht, handelt es sich wohl fast durchweg um sichere Syphilitiker. Fall 11 und 12 wurden mehrfach untersucht, bei dem Tabiker trat später wieder positive Sternsche Reaktion ein, schließlich war die Reaktion nach beiden Methoden negativ, bei dem Fall von Lues III war auch später die Wassermannsche Reaktion negativ, immerhin verschwindet die Reaktion nach Stern also eher als die nach Wassermann, sie kann demnach wenigstens in diesen Fällen nicht als feiner angesehen werden. So habe ich in 8 Proz. der Fälle nach Wassermann positive Reaktion, während die Seren nach der Versuchsanordnung von Stern negativ reagierten. Diese hohe Prozentzahl ist bei anderen Nachuntersuchungen nicht gefunden worden, Meirowski berichtet von nicht ganz 1 Proz., und Schlimpert stellte fest, „daß ein negativer Ausfall der Reaktion nach Stern nie bei gleichzeitig positivem Ergebnis nach Wassermann vorkam“.

Weniger häufig, wie schon erwähnt, fand sich das umgekehrte Verhältnis. Positiv nach Stern bei negativer Reaktion nach Wassermann fanden sich unter den 200 Seris 9, und zwar folgende:

- 1) präsenile Demenz, Arteriosclerosis gravis,
- 2) multiple Sklerose,
- 3) multiple Sklerose,
- 4) Vitium cordis,
- 5) Tabes,
- 6) Gumma des Sternums, Sattelnase,
- 7) Epilepsie,
- 8) Lues III,
- 9) Lues III.

In den letzten 6 Fällen ist höchstwahrscheinlichluetische Infektion vorangegangen, jedenfalls nicht auszuschließen, hier ist der Ausfall der Reaktion nach Stern also der gewünschte; in den übrigen ist dagegen an unspezifische Hemmungen zu denken, wie sie ja auch schon M. Stern selbst (3 Fälle) und Schlimpert (2 Fälle) speziell bei kachektischen Kranken gefunden haben. Auch in meinen Fällen handelt es sich um solche Kranke. Stern rät daher mit Recht von der Anwendung ihrer Versuchsanordnung bei konsumierenden Krankheiten ab. Aber sehen wir von diesen 3 Fällen ab, so bleiben nur noch 6 (= 3 Proz. der Fälle), in denen der Ausschlag durch die Sternsche Modifikation ein feinerer war. Demgegenüber stehen nun nach meinen Untersuchungen 8 Proz., in denen die ursprüngliche Wassermannsche Methode zu besseren Resultaten geführt hat.

Ich habe mir die Frage vorgelegt, wie dieses unter genauer Beobachtung der Vorschriften erhaltene Ergebnis in Einklang zu bringen sein könnte mit dem Befunde der übrigen Untersucher. Die einzigen Faktoren, die bei der Sternschen Versuchsanordnung Schwankungen unterliegen, sind das Komplement und das Antigen. Es ist bekannt, daß der natürliche Komplementgehalt des Serums sehr verschieden sein kann, und es wäre die Möglichkeit vorhanden, daß bei sehr hohem Gehalt an Komplement nur ein Teil gebunden würde, der restierende aber noch genügte, um totale Hämolyse herbeizuführen. Derartige Fälle aber müßten den anderen Autoren auch vorgekommen sein. Zudem ist M. Stern auf Grund zahlreicher Versuche der Ansicht, „daß der Komplementgehalt durchaus nicht den großen Schwankungen unterworfen ist, wie man dies bisher anzunehmen gewohnt war“.

Ich vermute daher eher gewisse Unterschiede in den Extrakten. Ich verwandte nacheinander 3 verschiedene alkoholische Extrakte ausluetischen Lebern, die sämtlich nach der Wassermannschen Methode dauernd sichere Resultate ergaben. Auffallend war jedoch, daß bei Verwendung des letzten Extraktes in 40 untersuchten Fällen niemals bei positiver Reaktion nach Wassermann negative Sternsche Reaktion vorkam, wohl einige Male das Umge-



kehrte. Hier wäre also völlige Uebereinstimmung mit den anderen Autoren vorhanden.

### Zusammenfassung.

Mag dem aber auch so sein, so ist die Tatsache nicht abzuleugnen, daß bei Anwendung gewisser bei der Wassermannschen Reaktion sicher wirkender Extrakte die Sternsche Versuchsanordnung zu Fehldiagnosen Anlaß geben kann. Nur für bestimmte Extrakte sind die Sternschen Angaben zutreffend.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus der Abteilung für experimentelle Therapie des Eppendorfer Krankenhauses, Hamburg (Oberarzt: Dr. Much).]

### **Fibrinbildende und -auflösende Wirkung von Staphylokokken (Staphylokinase und Staphylofibrinolyse).**

Von Dr. Hans Kleinschmidt.

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. September 1909.)

Von allen Bakterien sind wohl die Staphylokokken die vielseitigsten, wenigstens sind ihre Lebensäußerungen am eingehendsten studiert und bekannt geworden. Die biologische Wirksamkeit der Staphylokokken ist außerordentlich mannigfaltig. Neben der Farbstoffbildung erwähne ich nur ihre leimlösende, fettverseifende, peptonisierende, leukotoxische, katalytische, nephrotoxische und hämolytische Fähigkeit. Vor kurzem konnte nun Much<sup>1)</sup> eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen des *Staphylococcus aureus* nachweisen, die er Staphylokinase nannte. Er fand, daß beim Einsäen von Staphylokokken in Menschen- oder Pferdeplasma innerhalb kurzer Zeit Gerinnung eintrat. Diese gerinnungsauslösende Eigenschaft besaßen lediglich Stämme von *Staphylococcus aureus*, während bei *albus* und *citreus* und zahlreichen anderen Mikroorganismen eine gerinnungsverursachende

---

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 14, 1908, Heft 1 u. 2.

Wirkung nicht nachgewiesen werden konnte. Dieselben Befunde wurden von Zeißler<sup>1)</sup> erhoben und auch auf Hammel-, Rinder- und Schweineplasma ausgedehnt.

Auch ich kam bei der Nachprüfung der Muchschen Versuche zu dem gleichen Ergebnis mit dem einen Unterschied, daß auch ein Stamm von *Staphylococcus albus* im Pferdeplasma Gerinnung hervorzubringen imstande war, allerdings erst längere Zeit nach der Einsaat. Während nämlich Aureus-Stämme innerhalb spätestens 5 Stunden das Pferdeplasma zum Gerinnen bringen, trat bei Albus erst nach 6—8 Tagen eine Gerinnung ein, und zwar vollständig nur in leukocytenhaltigem Plasma (L-Plasma). Uebrigens war Much, wie aus nicht veröffentlichten Versuchen hervorgeht, die sich an die erste Arbeit anschlossen, diese Tatsache schon bekannt. Er fand sogar bei mehreren Albus-Stämmen schon nach 3 Stunden Netzbildung und nach 24 Stunden Gerinnung, in der Regel scheint allerdings die Gerinnung bei Albus erst nach Tagen einzutreten, zuweilen sogar völlig auszubleiben. Eine Umwandlung von Albus in Aureus findet während dieser Zeit nicht statt. Wenn ich aus dem mit Albus beschickten Plasma nach Eintritt der Gerinnung abimpfte, wuchsen stets wieder Staphylokokken in Reinkultur, die auch bei längerem Stehenlassen der Platten in diffusem Tageslicht keine Farbstoffbildung aufwiesen. Es zeigt sich also auch in dieser Tatsache wieder, daß Albus, wie er sich in seinem Vorkommen, seiner Pathogenität und dem biologischen Verhalten nicht von Aureus unterscheiden läßt, so auch in der gerinnungsauslösenden Fähigkeit dem Aureus analog zu setzen ist. Es besteht nur ein gradueller Unterschied.

In der oben erwähnten Arbeit hebt nun Much weiterhin besonders hervor, „daß manche durch Staphylokokkenzusatz zum Gerinnen gebrachte Plasmasorten nach einiger Zeit wieder gelöst waren“. Ueber diese fibrinolytische Eigenschaft habe ich weitere Untersuchungen angestellt. Ich legte zunächst Röhrchen mit 2 ccm Pferdeplasma und -L-Plasma<sup>2)</sup> an

1) Mitteilungen aus den hamburg. Staatskrankenanstalten, Bd. 9, 1909, Heft 6.

2) Das Plasma wurde gewonnen durch Auffangen des Blutes mit Natriumcitrat (cf. die Arbeit Much's). Plasma heißt die von allen Form-

und setzte je eine Oese von 6 verschiedenen Aureus-Stämmen zu, die frisch aus Abszessen oder dem Blut von Menschen gezüchtet waren. Nachdem in typischer Weise innerhalb  $1\frac{1}{2}$ —5 Stunden bei  $37^{\circ}$  Gerinnung eingetreten war, begann nach 3—4 Tagen, während die Röhrchen bei Zimmertemperatur gehalten wurden, im reinen Plasma die Auflösung. Am 6. Tage waren alle Plasmagerinnsel gelöst. Wie unter den einzelnen Aureus-Stämmen ein Unterschied in der gerinnungsauslösenden Fähigkeit besteht, so ist dieser auch in der fibrinolytischen nachweisbar. Ein Plasma wurde schneller, eines langsamer wieder aufgelöst. Im L-Plasma trat die Lösung langsamer ein, erst am 5. Tage zeigten 2 Röhrchen beginnende Auflösung. Eine Uebereinstimmung in der Schnelligkeit der Auflösung durch die verschiedenen Stämme im Plasma und L-Plasma war nicht zu bemerken. Erst am 10. Tage war auch das L-Plasma überall gelöst.

Tabelle I.

Staph. aureus	A	B	C	D	E	F	albus
12 Tage nach Anlegung des Versuches							
Plasma	+++	+	+++	+	+++	+	+++
L-Plasma	+	+	+	+	++	+	+
20 Tage nach Anlegung des Versuches							
Plasma	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
L-Plasma	+++	+++	+	++	+++	+	+

Es bedeutet: + wenig, ++ mäßig, +++ starke Auflösung.

Vorstehende Tabelle (I) gibt ein klares Bild davon, wie sich die Lösungsverhältnisse der einzelnen Plasmata gestalteten. In dieser Versuchsreihe wurde die doppelte Plasmamenge gewählt, die Auflösung ging daher entsprechend langsamer vor sich.

Sehen wir hier also eine Wiederauflösung von Gerinnseln, an deren Bildung sich die Staphylokokken selbst zuvor beteiligt haben, so sind sie doch auch schon in frischem Zustande imstande, eine fibrinolytische Wirkung auszuüben. In

elementen durch Zentrifugieren befreite Flüssigkeit; L-Plasma enthält auch noch die leukocytären Elemente.

der Literatur finden sich, soweit ich das übersehen konnte, nur spärliche diesbezügliche Angaben. Rietsch<sup>1)</sup> versetzte unter anderen Bakterien auch Staphylokokken in Peptonlösung mit Alkohol, filtrierte den gebildeten Niederschlag ab, wusch diesen wiederholt und trocknete ihn zu einem Pulver ein. Beim Zusammenbringen dieses Pulvers mit Fibrin in neutraler oder schwach alkalischer Lösung erwiesen sich die Staphylokokken befähigt, Fibrin zu verdauen. In F. Müllers Vortrag: „Ueber die Bedeutung der Selbstverdauung bei einigen krankhaften Zuständen“<sup>2)</sup> findet sich die kurze Angabe: „Staphylokokken lösen Fibrin langsam, Lungenstückchen werden jedoch in einer Staphylokokkenkultur kaum weiter verändert als in einem Kontrollröhrchen mit steriler Bouillon, wobei nur die der Lunge selbst zukommenden autolytischen Vorgänge zur Geltung kommen.“

Ich habe entsprechende Versuche mit Karminfibrin und geronnenem Plasma angestellt.

1) 2 ccm sterile Bouillon enthaltende Röhrchen wurden mit einem jedesmal gleich großen Stückchen Karminfibrin beschickt und dann 1 Oese Staphylokokken von 24-stündiger Agarkultur in der Bouillon verrieben. Das Resultat nach 48-stündiger Einwirkung bei Zimmertemperatur ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle II.

Staphylococcus	A	B	C	D	E	F	albus	Kontrolle Bouillon
	++	0	++	++	+	0	+	0

Zeichenbenennung s. oben.

Also auch hier wieder individuelle Verschiedenheiten zwischen den einzelnen Stämmen. Die Lösung ist bei Anwendung des Karminfibrins leicht an der mehr oder weniger intensiven Rotfärbung der Bouillon zu erkennen.

2) 1 ccm Pferdeplasma (Natriumcitrat-Plasma) wurde zunächst durch Serumzusatz zum Gerinnen gebracht, d. h. 1 ccm Pferdeserum wurde mit 1 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normallauge 10 Minuten bei 37° zusammengebracht, dann 1 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalsäure zugefügt und von dieser Mischung 1 ccm zu der

1) Ref. Baumgartens Jahrbücher, Bd. 3, 1887.

2) Verhandl. des Kongr. f. inn. Mediz., 1902.

gleichen Menge Pferdeplasma gebracht. Impfte ich nun nach dem Eintritt der Gerinnung 1 Oese Staphylokokken ein, so traten bei Bruttemperatur (37°) nach ca. 10 Tagen die ersten Zeichen der Auflösung ein, und nach 12—14 Tagen — auch hier waren ähnliche individuelle Unterschiede zu bemerken — war das Plasma verflüssigt.

Ähnliche Resultate erhält man, wenn man kleinere geronnene Plasmastücke in Bouillon bringt und hierzu Staphylokokken einsät. Im Gegensatz zu den Staphylokokken vermögen nicht Fibrin zu lösen: *Pneumococcus lanceolatus*, *Streptococcus erysipelatos*, *Bact. coli commune*.

Sowohl die gerinnungserregende als auch die fibrinolytische Wirkung der Staphylokokken ist an die Leiber derselben gebunden. Mit Bouillonkulturfiltraten (5 Tage bei 37°, dann Filtrieren durch Berkefeld-Filter) läßt sich beides nicht auslösen. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied, z. B. zum Staphylolysin und Leukocidin, dar, die in Filtraten enthalten sind.

Kehre ich nunmehr zurück zu dem Phänomen, daß durch Staphylokokken geronnene Plasmasorten nach längerem Stehen wieder von selbst aufgelöst werden, so erklärt sich dies offenbar folgendermaßen: Bringt man Staphylokokken in Plasma, so ist das geeignete Medium für eine Gerinnung gegeben, die Staphylokinase entfaltet ihre Wirksamkeit; ist aber das Plasma einmal geronnen, so ist der geeignete Angriffspunkt für das fibrinauflösende Ferment vorhanden. Dieser Prozeß erfordert jedoch im Gegensatz zur Fibrinbildung, die in wenigen Stunden eintritt, eine weit längere Zeit. Viele Tage oder Wochen gehen darüber hin, bis das Plasma wieder vollständig verflüssigt ist. Dies kann daran liegen, daß das fibrinolytische Ferment — denn um ein solches muß es sich handeln — schwächer ist; oder aber es entsteht während des Auflösungsprozesses ein Ineinandergreifen der beiden wirksamen Faktoren, indem immer wieder das eben aufgelöste Plasma durch die noch vorhandene Staphylokinase zum Gerinnen gebracht wird und umgekehrt.

Dies wäre leicht zu entscheiden, wenn wir die Möglichkeit hätten, zu einem beliebigen Zeitpunkt einen der beiden Faktoren auf irgendeine Weise auszuschalten. Vorläufig stößt dies allerdings auf große Schwierigkeiten, immerhin

aber gelang es mir, das verflüssigte Plasma wieder zum Gerinnen zu bringen, und zwar mit Hilfe von Phenol. Brachte ich einige Tropfen des aufgelösten Plasmas oder L-Plasmas in mit Aq. dest. oder physiologischer Kochsalzlösung verdünnte Phenollösung, so trat sofort Gerinnung ein. Dieses Phänomen erwies sich als durchaus spezifisch für das durch Staphylokokkeneinwirkung aufgelöste Plasma. Ob aber die Gerinnung zuvor durch Staphylokokken oder auf andere Weise zustande gekommen ist, ist dabei gleichgültig. Es tritt nicht ein, wie ich oft sehen konnte, wenn man gewöhnliches Plasma oder L-Plasma (Mensch, Pferd) in Phenollösung bringt. Es handelt sich also nicht etwa um eine Eiweißfällung. Man sieht deutlich fädige, netzartige Gerinnsel auftreten. Löst man geronnenes Plasma durch andere Bakterien auf, z. B. durch Proteus oder Heubacillus, und verwendet dies wieder verflüssigte Plasma, so läßt sich keine Gerinnung nachweisen. Nach Erhitzen des Plasmas auf 58° (1/2 Stunde) ist das Phänomen nicht mehr auslösbar. Dies beruht offenbar auf dem Untergang der Staphylokokken selbst. Denn es handelt sich hier um Lebensäußerungen der Staphylokokken, die an ihren Körper gebunden sind. Wir können, wie erwähnt, keine in die Kulturflüssigkeit abgegebenen Produkte gewinnen, die Fibrinbildung oder -auflösung bewirkten.

Tabelle III.

Phenol in Aq. dest.		0,25 %	0,5 %	1,25 %	2,5 %	Kontrolle Aq. dest.
Staph. aureus	Plasma	0	0	0	0	0
	L-Plasma	0	0	0	0	0
A	Plasma	0	0	0	0	0
	L-Plasma	+	+++	++	+	0
Stamm B	Plasma	0—+	+	++	+++	0
	L-Plasma	0—+	+	++	+++	0
Stamm D	Plasma	0	0	0	0	0
	L-Plasma	0—+	+	++	+++	0
Stamm E	Plasma	+	+++	+++	++	0
	L-Plasma	0	+	0	0	0
Staphylo- coccus albus	Plasma	0	0	+	+	0
	L-Plasma	0	0	0	0	0
Geronnenes Plasma, durch Staphylokokk. verflüssigt		0	+	++	+++	0

0 bedeutet keine Gerinnung, + wenig, ++ mäßig, +++ starke Gerinnung.

Vorstehende Tabelle III entnehme ich meinen Protokollen, um zu zeigen, wie sich die einzelnen Plasmasorten der Einwirkung des Phenols gegenüber verhielten. Auffallend ist hierbei, daß zuweilen beide Staphylokokken-Plasmasorten, zuweilen dagegen nur das gelöste Staphylokokken-Plasma oder das gelöste Staphylokokken-L-Plasma geronnen ist. In dieser Beziehung kommen allerdings merkwürdige Unregelmäßigkeiten vor, die von dem Zeitpunkt der Auflösung oder der Zeit, die seit der vollständigen Verflüssigung vergangen ist, offenbar abhängig zu machen sind. Denn ich konnte verschiedentlich beobachten, daß bei der ersten Prüfung gelöstes Staphylokokken-Plasma und -L-Plasma gerann, bei der zweiten, nach einiger Zeit vorgenommenen, nur eines von beiden und umgekehrt. Es dürfte hier wohl der verschiedene Gehalt an Staphylokinase oder fibrinolytischem Ferment (Staphylofibrinogen) maßgebend sein. Dies aber quantitativ zu bestimmen, ist deshalb sehr schwer möglich, weil man nicht genügend große Plasmamengen in dieser Weise gewinnen kann. Die Gefahr der Verunreinigung ist bei der langen Dauer des Auflösungsprozesses schon bei kleinen Mengen nur mit Mühe zu umgehen.

Ich mußte mich deshalb darauf beschränken, nachzuweisen, daß sowohl Staphylokinase als fibrinolytisches Ferment in dem wiederaufgelösten Plasma gleichzeitig in wirksamer Form vorhanden sind. Es wirkte mit frischem Pferde- oder Menschenplasma zusammengebracht bzw. mit geronnenem, ebenso wie Staphylokokken von frischen Agarkulturen, indem es in dem einen Fall Gerinnung nach kurzer Zeit, in dem anderen langsame Auflösung zustande brachte.

Ferner ist in der Tabelle noch bemerkenswert, daß die Gerinnung zwar gewöhnlich quantitativ der steigenden Konzentration der Phenollösung parallel geht, daß aber auch hier Ausnahmen vorkommen, insofern die Gerinnung in der Konzentration von 2,5 Proz. zuweilen schwächer ist als in der von 1,25 Proz. Dies beruht wohl auf der verschieden schnellen Abtötung der einzelnen Staphylokokkenstämme durch das Phenol. Bei noch stärkeren Konzentrationen werden sie alle sofort abgetötet und das Phänomen ist daher nicht mehr auszuführen.

Worauf beruht nun die plötzliche Auslösung des Gerinnungsprozesses, der, wie noch einmal hervorgehoben werden soll, nur eintritt in einem Plasma, das geronnen war und dann durch Staphylokokken — und lediglich durch diese — wieder aufgelöst wurde? Vielleicht kommt hier die Zerstörung des fibrinolytischen Fermentes in Betracht. Die Staphylokinase kann dann allein ihre Wirksamkeit entfalten und tut dies nun in Verbindung mit dem Phenol weit schneller, als es unter anderen Umständen beobachtet wird. Daß mit dieser Möglichkeit zu rechnen ist, schließe ich daraus, daß auch in einer Konzentration, in der die Staphylokokken in ihrer Lebenstätigkeit nicht unmittelbar beeinträchtigt werden, eine Wiederauflösung des Gerinnsels nicht stattfindet. Betrachte ich Staphylokokken in Phenollösungen von 0,25 oder 0,5 Proz., so ließen sich noch nach Stunden reichlich Kolonien auf Agar züchten.

Oder aber es handelt sich um einen komplizierteren Vorgang, in dem das Phenol die Rolle eines Aktivators der Staphylokinase spielt. Dann wäre allerdings die höchst eigentümliche Tatsache zu konstatieren, daß diese aktivierende Fähigkeit nur eintritt in einem Plasma, das schon einmal geronnen war, das dann aber durch Staphylokokken aufgelöst wurde. In diesem gelösten Zustande verbleibt es. Aus sich selbst kann die Staphylokinase das durch Staphylofibrolysin gelöste Plasma nicht wieder zur Gerinnung bringen. Erst durch das Hinzutreten von Phenol wird es dazu befähigt.

Daß das Phenol nur dann aktivierend wirkt, wenn das Plasma zuvor schon einmal geronnen war, geht aus Versuchen hervor, die ich mit frischen, in frischem Plasma verriebenen Staphylokokken anstellte. Derartiges Plasma, in verdünnte Phenollösung gebracht, gerann nicht sofort, sondern erst nach einigen Stunden. Der Prozeß verlief also genau so, als ob kein Phenolzusatz erfolgt wäre, als ob lediglich frische Staphylokokken in Plasma gebracht worden wären<sup>1)</sup>.

1) Daß durch *Proteus* oder *Heubacillus* verflüssigtes Plasma nicht dieses Phänomen gibt, erklärt sich mit Leichtigkeit aus dem Mangel an Thrombokinese.



Jedenfalls ist diese Wirkung eines chemisch wohl definierbaren Stoffes auf biologisch so komplizierte Vorgänge, wie sie bei der Gerinnung in Betracht kommen, von nicht unerheblichem Interesse. Vielleicht wird durch die mit Staphylokokken erhaltenen Resultate die Erklärung des Gerinnungsphänomens noch komplizierter als bisher. Vielleicht wird aber auch umgekehrt die Erklärung vereinfacht. Das läßt sich indessen bis jetzt noch nicht überblicken.

#### Zusammenfassung.

1. Jeder Stamm von *Staphylococcus aureus* ist imstande, innerhalb kurzer Zeit Plasma zum Gerinnen zu bringen.

2. Auch viele Albusstämme haben diese Eigenschaft, doch ist die Wirkung graduell verschieden.

3. Dies Phänomen beruht auf der in Staphylokokken enthaltenen Kinase (Staphylokinase-Much).

4. Außer der Kinase enthalten Staphylokokken auch ein fibrinolytisches Ferment (Staphylofibrolysin).

5. Kinase und Fibrolysin sind an die Leiber der lebenden Staphylokokken gebunden.

6. Bringt man durch Staphylokokken verflüssigtes Plasma, das vorher geronnen war, in verdünnte Phenollösung, so tritt schnell wieder Gerinnung ein.

7. Die aktivierende Wirkung von Phenol erstreckt sich nur auf Staphylokokken. Sie tritt nur ein in einem Plasma, das, auf irgend einer Art zum Gerinnen gebracht, später durch *Staphylococcus* wieder aufgelöst wurde.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Königl. Institut für Infektionskrankheiten in Berlin  
(Abteilung des Herrn Geh. Med.-Rats Prof. Dr. Wassermann).]

### **Ueber Verschleierung der Wassermannschen Reaktion durch Komplementoidverstopfung.**

Von San.-Rat Dr. Wechselmann,

dirig. Arzt der dermatolog. Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses.

(Eingegangen bei der Redaktion am 7. September 1909.)

Nach allen Untersuchungen kann es keinem Zweifel unterliegen, daß die Wassermannsche Reaktion, gleichgültig wie man ihr eigentliches Wesen erklärt, wohl das regelmäßigste Symptom der Syphilis darstellt. Um so auffälliger muß es erscheinen, daß eine biologische Reaktion von solcher Feinheit in einer Reihe von Fällen von sicherer florider Syphilis versagt, eine Tatsache, die von allen Beobachtern festgestellt, aber nach keiner Hinsicht erklärt worden ist. Schon der Umstand, daß die Reaktion nur vorübergehend, z. B. während oder nach einer Quecksilberkur, schwindet, legt den Gedanken nahe, daß ein so fast gesetzmäßig, in allen Fällen von manifester Lues vorhandenes Phänomen zwar vorhanden sein müßte, aber durch irgendwelche Umstände bei den gebräuchlichen Untersuchungsmethoden nicht in Erscheinung treten könnte. Abgesehen von der von Sachs-Altmann (1) angedeuteten Möglichkeit, daß die im Syphilisserum vorhandene wirksame Substanz durch die gleichzeitige Gegenwart sehr reichlicher Mengen gegen Hammelblutkörperchen gerichteten hämolytischen Ambozeptors, welcher ja, wie schon Wassermann (2) angibt, in jedem Menschen Serum enthalten ist, verdeckt sein könnte, mußte dabei vor allem an Störungen im Mechanismus der Ambozeptorwirkung gedacht werden. Diese könnten sich einmal an der cytophilien Gruppe abspielen, sei es, daß es sich gelegentlich um Ambozeptoroidbildung [Neisser-Friedemann (3)], d. h. um ihrer cytophilien Gruppe beraubte Ambozeptoren, oder um gegen die cytophile Gruppe gerichtete Antiambozeptoren handelt, deren Existenz [von Ehrlich-Sachs (4) als möglich, aber nicht erwiesen betrachtet,] von

Friedberger-Moreschi (5) nachgewiesen worden ist; unter beiden Voraussetzungen würde die haptophore Gruppe des Ambozeptors sich nicht mit dem Antigen vereinigen können und daher die durch diese Bindung hervorgerufene Steigerung der Avidität zum Komplement ausbleiben müssen. Viel wahrscheinlicher aber, als diese durchaus möglichen Annahmen, erschienen mir Störungen in dem an und für sich labileren komplementophilen Komplex des Ambozeptors zu sein. Vor allem lag nach den Untersuchungen Ehrlichs (6) die Vorstellung nahe, daß im Syphilisserum, welches ja wie jedes Serum die verschiedensten Komplemente enthält, gelegentlich auch Komplemente und bei der gewöhnlichen Art der Inaktivierung durch Erwärmen auf 56° Komplementoide auftreten könnten, welche die komplementophile Gruppe des Ambozeptors derartig besetzen und verstopfen, daß dadurch die Bindung des zugesetzten Meerschweinchenkomplementes verhindert werden konnte. Von den verschiedenen Wegen zum Nachweis der Komplementoidverstopfung, die Ehrlich angegeben hat, erschien mir zu einer sicheren Beurteilung besonders die Absorption geeignet. Wir wissen durch die Arbeiten von v. Dungern, Wilde, Ehrlich und Sachs, Haile etc., daß durch Hefe, Kaolin etc. einem Serum die Komplemente und Komplementoide entzogen werden können. Nach meiner Voraussetzung mußte das Serum eines floriden Syphilitikers, welches sich bei der gewöhnlichen Anstellung der Wassermannschen Reaktion als negativ erwies, einen positiven Ausschlag geben, wenn es durch Absorption seiner sämtlichen Komplemente und Komplementoide beraubt und daher für Meerschweinchenkomplement wieder bindungsfähig wurde.

Diese Voraussetzung trifft tatsächlich in einer großen Zahl von Fällen zu. Nach verschiedenen Vorversuchen mit Hefe (sterilisierte Reinkultur), Kaolin etc. erschien es mir schließlich am vorteilhaftesten, nach den Angaben von Gengou (7), eine etwa 7-proz. Aufschwemmung von frisch gefälltem Baryumsulfat zur Absorption der Komplementoide zu benutzen. Die Methodik war dabei folgende: 0,9 ccm inaktiviertes Serum eines Syphilitischen, das in der gewöhnlichen Wassermannschen Versuchsanordnung negativ reagiert, werden mit 3 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 0,5 der Baryumsulfat-

aufschwemmung durchgeschüttelt, eine Stunde lang in den Brutschrank bei 37° gestellt, dann sehr sorgfältig zentrifugiert und, wenn die Flüssigkeit ganz klar ist, davon 2 ccm (zur Kontrolle als doppeltes Serumquantum) und 1 ccm in je ein Reagenzröhrchen vorsichtig zur Anstellung der Reaktion abgefüllt; daneben wird ein Röhrchen mit 0,2 ccm inaktiviertem Serum in der gewöhnlichen Weise auf die Wassermannsche Reaktion geprüft. Als Antigen wurde wässriger Extrakt von syphilitischer Fötalleber und genau ausgetasteter alkoholischer Extrakt von Dr. Kirstein, meist beide nebeneinander, verwendet. Die Ablesung erfolgte 24 Stunden nach der üblichen Anstellung der Reaktion, und wurden nur diejenigen Fälle als positiv bezeichnet, in welchen eine rote Kuppe von heller Flüssigkeit überschichtet war, während die anfänglich gehemmt erscheinenden Gläschen, in welchen nach 24 Stunden nur ein weißlicher Schleim sich zu Boden gesenkt hatte, nicht gezählt wurden.

Die Kontrolle von 72 Seren verschiedener nicht-syphilitischer Patienten (Psoriasis, Gonorrhöe, Acuminaten, Ekzem, Ulcera molliä, Lyssa, perniziöse Anämie, adenoide Vegetationen, Urticaria, Stomatitis aphthosa, Erythema nodosum, sowie auch mehrere ganz frische Primäraffekte) ergab niemals bei den mit Baryumsulfat versetzten Seren eine Hemmung. Hingegen zeigten 66 Syphilitische ausnahmslos bei unserer Methode positive Reaktion, und zwar gaben dabei meistens auch die bei gewöhnlicher Prüfung nur geringe Hemmungen zeigenden Sera einen starken Ausschlag.

Die durch Komplementoidverstopfung verschleierte Reaktion wurde in 41 Fällen klar aufgedeckt, und zwar waren dies 19 Fälle mit manifester frischer Syphilis. 10 waren unmittelbar nach der Kur frei von Syphiliserscheinungen, 5 von diesen waren vor der Kur stark positiv; 7 Fälle betrafen Lues latens der ersten 1—3 Jahre, 5 Fälle Lues latens 4 bis 10 Jahre alt. Zu diesen letzten 5 Fällen ist folgendes zu bemerken:

Pat. W., vor 10 Jahren infiziert mit 20 Einreibungen mit grauer Salbe und Jodkali behandelt, vor 6 Jahren Ausschlag, der ohne Behandlung verschwand, vor einem Jahre Ikterus, der als Lebersyphilis erkannt und mit einer Schmierkur von 92 g behandelt wurde; jetzt besteht Schwäche

und Zuckungen im rechten Arm; träge Reaktion und Differenz der Pupillen.

Frau L., deren Mann 1900 infiziert wurde, eine Spritzkur durchmachte und später von Erscheinungen frei blieb, heiratete in demselben Jahre. 1902 ein jetzt noch lebendes syphilitisches Mädchen geboren. 1906 Knabe mit Syphilis, der geheilt wurde und später ertrank. Vater, Tochter geben, obgleich frei von Erscheinungen, positive Wassermannsche Reaktion. Die gravide Mutter macht eine Schmierkur von 90 g durch. Nach der Entbindung ist die Reaktion bei Mutter und Kind nach Wassermann negativ, die der Mutter wird aber nach unserer Methode stark positiv.

Fall Cz. betrifft einen vor 4 Jahren infizierten Ehemann, der nach mehreren Kuren frei von Erscheinungen blieb, während seine Frau eine ungewöhnlich schwere Lues maligna darbietet. Die beiden anderen Fälle betreffen ältere, von Lueserscheinungen freie Patienten.

Erwähnen möchte ich noch, daß 2mal die Reaktion bei Frischentbundenen nur nach Entfernung der Komplementoide positiv war, während die neugeborenen Kinder negativ reagierten; das eine dieser Kinder blieb während mehrwöchentlicher Beobachtung gesund.

17 Sera von Patienten, welche Syphilis hatten oder früher durchgemacht hatten, blieben auch bei der Prüfung mit unserer Methode negativ. 6 von diesen Fällen können als zweifelhaft oder geheilt angesehen werden.

1) S., 1896 infiziert, mehrere Kuren; Ulcus crur.luet. am 4. VIII 1908. Nach 120 g Ugt. cin. Heilung. W. R. negativ; 5. VII. 1909 Ulcus cruris. W. R., auch mit Baryum negativ. — 2) G., vor 8 Jahren Schmierkur; danach niemals Erscheinungen, jetzt Balanitis. — 3) R., 1888 Ulc., 3 Kuren; nie Ausschlag, nie Erscheinungen an den Schleimhäuten; 1894 Ehe, 7 gesunde Kinder, nie Abort bei der gesunden Frau. 1898 Doppeltsehen, Schmierkur, Heilung; wiederholt 1900 und 1902. W. R. nach beiden Methoden negativ. — 4) St., vor 5 Jahren infiziert, mehrere intensive Kurven. Hysterische Lähmung. Serum und Spinalflüssigkeit nach beiden Methoden negativ. — 5) H., infiziert vor 20 Jahren; 2 Kuren. Kopfschmerzen. Nach beiden Methoden negativ. — 6) Ebenso J., vor 9 Jahren Bubonen, 3 Spritz- und eine Schmierkur. Fluor und Elephantiasis urethrae.

Daran schließt sich ein 2 Jahre alter Fall von Lues, welcher nur noch Drüsenschwellung und Leukoderm zeigte und nach einer Schmierkur von 120 g nach beiden Methoden negativ reagierte.

In 3 Fällen handelte es sich um Lues maligna, welche in jeder Beziehung eine Ausnahmestellung einnimmt. 2 andere Fälle von Lues maligna gaben eine negative Wassermann-

sche Reaktion, waren aber nach unserer Methode deutlich positiv.

Nur in 3 Fällen mit Syphiliserscheinungen blieb die Reaktion auch bei unserer Methode negativ, von denen der eine Primäraffekt und ganz frisches Exanthem zeigte, wo also die Wassermannsche Reaktion manchmal noch nicht nachweisbar ist<sup>1)</sup>, der andere aber seit 7 Wochen Primäraffekt, Scleradenitis, papulöses Exanthem aufwies und am 23. VII. 1909, sowie während der Schmierkur am 12. VIII. 1909 untersucht wurde. Ein Fall frischer makulöser Syphilis war, nach Einreibung von 52 g Quecksilbersalbe untersucht, mit beiden Methoden negativ.

Dann wurden noch 4 Fälle von frischer makulöser und papulöser Syphilis mit ausgesprochener Wassermannscher Reaktion nach einer Schmierkur von 120 g nach beiden Methoden negativ; der eine davon blieb es auch bei einer 5 Wochen später ausgeführten Untersuchung. — Ferner reagierte eine schwangere Patientin St. mit Genitalpapeln am 22. V. nach Wassermann negativ, auf Kaolinzusatz stark positiv; nach Schmierkur war und blieb am 10. VII. und 15. VIII. die Wöchnerin und das Kind frei von Erscheinungen und negativ auch bei Baryumsulfatprüfung.

Es scheint danach bei wirklich manifester Lues — die Lues maligna abgerechnet — eine negative Reaktion nach Ausschließung der Komplementoidverstopfung nur sehr selten zu sein. Es erweckt auch den Anschein, daß ein Syphilisserum, welches auch bei der Prüfung nach unserer Methode negativ reagiert, und zumal wenn diese negative Reaktion auch bei späterer Untersuchung anhält, eine günstigere prognostische Beurteilung zuläßt. Doch können hierüber, sowie über die Bedeutung des negativen Ausfalles der Baryumsulfatprobe für die definitive Heilung erst noch längere Zeit fortgesetzte Untersuchungen Aufschluß geben. Einen gewissen Hinweis gibt vielleicht die Beobachtung eines jungen Mannes, welcher 1908 ohne nachweisbaren Primäraffekt leichte Plaques der Tonsillen und Wassermannsche Reaktion aufwies, nach

1) In einem ganz analogen Fall von Primäraffekt der Lippe mit papulösem Exanthem war die Reaktion am 14. VIII. nach beiden Methoden negativ und 10 Tage später ebenso positiv.

2 Kuren im Januar von Erscheinungen frei blieb, 1909 noch Wassermannsche Reaktion zeigte, nach nochmaliger Kur (Hydr. salic. 0,9) im Juni nur mit Baryumsulfat Reaktion ergab, welche im Juli auch verschwand.

Abgesehen von der Verfeinerung der Wassermannschen Reaktion für Syphilis, ist als sicher anzunehmen, daß sich die Methode der Aufdeckung der Komplementoidverstopfung auch auf andere Untersuchungen, welche auf der Komplementablenkung beruhen, übertragen läßt. Jedenfalls gewährt es die größte wissenschaftliche Genugtuung, zu sehen, wie die zur Stütze einer Theorie ersonnenen genialen Gedankengänge und Experimente Ehrlichs sich wegen ihrer wissenschaftlichen Wahrheit zur Lösung praktischer Fragen verwenden lassen.

#### Zusammenfassung.

1) Ein großer Teil negativer Wassermannscher Reaktionen bei florider Syphilis wird durch Komplementoidverstopfung des Ambozeptors bedingt und läßt sich durch Behebung dieser in positive Reaktionen verwandeln.

2) Es scheint, daß Syphilisfälle mit dauernder negativer Reaktion (bei Ausschaltung der Komplementoidverstopfung) eine prognostisch günstige Beurteilung zulassen.

#### Literatur.

- 1) Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 18.
- 2) Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh., Bd. 51, 1906, p. 461 Anm.
- 3) Berl. klin. Wochenschr., 1902, No. 29, p. 677.
- 4) Ueber den Mechanismus der Antiambozeptorenwirkung [S.-A. aus Berl. klin. Wochenschr., 1905, No. 19 u. 20], p. 8.
- 5) Ueber die Antiambozeptoren gegen die komplementophile Gruppe des Ambozeptors. Berl. klin. Wochenschr., 1906, No. 31.
- 6) Gesammelte Abhandlungen: Ueber die Vielheit der Komplemente des Serums und Ueber den Mechanismus der Ambozeptorenwirkung.
- 7) Contribution à l'étude de l'adhésion moléculaire et de son intervention dans divers phénomènes biologiques. Arch. internat. de Physiol., T. 7, 1908.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der medizinischen Abteilung (Abteilungsvorsteher:  
Dr. A. Meyer) des Hygienischen Institutes in Bremen (mit der  
Oberleitung beauftragt: Prof. Dr. Tjaden.)]

**Zur Frage der Serumüberempfindlichkeit.**

Von Dr. H. Braun,  
Assistent am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. September 1909.)

Trotz der zahlreichen Untersuchungen, die in jüngster Zeit dem Theobald Smithschen Phänomen gewidmet wurden, ist die Natur des anaphylaktischen Reaktionskörpers und seine Wirkungsweise unbekannt geblieben.

Otto hat auf Grund seiner wichtigen Untersuchungen über die passive Anaphylaxie folgern müssen, daß der Reaktionskörper an die Gehirnzellen gebunden sein müsse, um die Symptome der Ueberempfindlichkeit bedingen zu können. Denn er konnte die interessante Tatsache feststellen, daß zwischen der Injektion vom anaphylaktischen Reaktionskörper und dem Antigen ein Intervall von mindestens 24 Stunden verstreichen muß. Unsere Versuche lehrten uns, daß auch bei intravenöser Injektion des anaphylaktischen Serums eine Inkubation besteht, die allerdings unter diesen Bedingungen bisweilen nur auf einige Stunden verkürzt ist. In unseren Experimenten waren die unkontrollierbaren Resorptionsverhältnisse, die in den Versuchen Ottos bestanden haben, ausgeschaltet. Doch auch wir mußten die Annahme Ottos akzeptieren.

Ueber den Mechanismus der Ueberempfindlichkeit sind zahlreiche Theorien aufgestellt worden, die an dieser Stelle nicht besprochen werden sollen. In allerjüngster Zeit hat Friedberger in einer Kritik der Theorien über Anaphylaxie die These aufgestellt, daß die Serumüberempfindlichkeit aufgefaßt werden kann als „eine durch die eigentümlichen quanti-



tativen Verhältnisse und die besondere Lokalisation des Antikörpers bedingte eigentümliche Form der Eiweiß-Antieiweißreaktion in vivo“, eine Ansicht, die durch die in den letzten Tagen erschienene Arbeit von Doerr und Russ gestützt wird.

Wenn man auch Friedberger entschieden beipflichten muß, daß die Erscheinungen der Anaphylaxie durch die Annahme des Präzipitins im Gehirn eine einfache Erklärung finden würden, und daß auch die Tatsachen in keinem direkten Widerspruche damit zu stehen scheinen, so steht doch der exakte Beweis, der anaphylaktische Reaktionskörper sei mit dem Präzipitin identisch und der Mechanismus der Ueberempfindlichkeit ein so einfacher, aus. Denn es fehlte an geeigneter Methodik, um den Charakter des Reaktionskörpers bestimmen zu können.

So war es z. B. in der bisher angewandten Versuchsanordnung unmöglich, festzustellen, ob der Reaktionskörper direkt mit dem Antigen reagiert, da der Ehrlich-Morgenrothsche Absorptionsversuch nicht angestellt werden konnte. Es lag daher der Gedanke nahe, das Antigen in Form eines Antikörpers an Blutkörperchen oder Bakterien fixiert zu verwenden, da hierbei die Möglichkeit besteht, nach der erfolgten Aufschwemmung im anaphylaktischen Serum das Antigen mittels der Zentrifuge aus demselben zu entfernen. Wir bedienten uns zu unseren Versuchen des Pneumokokkenserums Merck, weil wir zur Reinjektion Pferdeserum benutzen wollten, das sich durch seine vollständige Ungiftigkeit für Meerschweinchen auszeichnet.

Um einwandfreie Resultate zu erhalten, war es zuerst unsere Aufgabe, zu prüfen, ob sich besetzte Pneumokokken<sup>1)</sup> zur Sensibilisierung eignen, da in dieser Versuchsanordnung der anaphylaktische Reaktionskörper durch dasselbe Antigen erzeugt wäre, durch welches er absorbiert werden sollte.

Wir haben folgende Versuche angestellt:

---

1) Sensibilisierte Cholerabacillen erwiesen sich wegen der eingetretenen Vibriolyse und Endotoxinwirkung als ungeeignet. Sensibilisierte Meerschweinchenerythrocyten konnten nicht verwendet werden, da das normale Pferdeserum gegen diese kein Hämolysin besitzt.

## Versuch I.

24 Stunden alte, auf Löffler Serum gewachsene Pneumokokkenkulturen<sup>1)</sup> wurden in je 2 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt und 1 Stunde im Wasserbad bei 60—63° erhitzt, nachher abzentrifugiert, in 1 ccm NaCl aufgenommen und zu jeder Kultur 0,2 ccm Pneumokokken-Immunserum Merck zugesetzt, 2 Stunden bei Bruttemperatur und 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Jede Kultur wurde danach 3mal in je 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Die sensibilisierten Kokken wurden an Meerschweinchen verimpft. Aus unseren Protokollen mögen folgende Experimente wiedergegeben werden:

## Tabelle I.

1. Meerschweinchen 250, g.

18. V. 3 $\frac{1}{2}$  h p. m. Sensibilisierte Pneumokokkenkultur in 3 ccm NaCl-Lösung intraperitoneal. — 5 h wenig polynukleäre Leukocyten. Starke Phagocytose. Frei keine Kokken.

7. VI. 3 $\frac{1}{2}$  h Temperatur 39°. — 4 h 5 ccm Pferdeserum intraperitoneal (= ip.). — 4 h 15' Kratzen, unwohl. — 4 h 30' unwohl, 37,5°. — 5 h schwer krank, 34°. — 6 h 37,2°.

8. VI. Munter.

2. Meerschweinchen, 250 g.

18. V. 3 $\frac{1}{2}$  h wie 1.

7. VI. 3 h 38' Temperatur 37,8. — 4 h 5 ccm Pferdeserum ip. — 4 h 15' Kratzen, unwohl. — 4 h 30' liegt auf der Seite, 35,5°. — 5 h moribund, 32°. — 5 $\frac{1}{4}$  h Krämpfe, Tod.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß man mit sensibilisierten Bakterien beim Meerschweinchen eine Ueberempfindlichkeit gegen das verwendete Immunserum verursachen kann. Dieselben sind auch noch in der Richtung hin bemerkenswert, als sie zeigen, daß die Anaphylaxie auch dann eintritt, wenn die Bakterien nicht der Auflösung, sondern der Phagocytose unterliegen, wie dies bei Pneumokokken der Fall ist. Die Absprengung von Antikörpern, wie sie bei der Vibriolyse von Pfeiffer und Friedberger, Bail und Tsuda nachgewiesen wurde, kommt hierbei nicht in Betracht. Um aber die Phagocytose intensiv und schnell eintretend zu gestalten, injizierten wir einer Reihe von Meerschweinchen vor der Pneumokokken-

1) Den Pneumococcusstamm verdanken wir der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. Landmann, des Leiters der bakteriologischen Abteilung der chemischen Fabrik Merck, und es ist dies derselbe Stamm, der in diesem Laboratorium zur Erzeugung des Immunserums verwendet wird.

einverleibung sterile physiologische NaCl-Lösung in die Bauchhöhle.

Ein Protokoll möge wiedergegeben werden:

Tabelle II.

Meerschweinchen, 300 g.

13. VII. 6<sup>h</sup> 5 ccm steriler NaCl-Lösung ip.

14. VII. Mit 0,1 ccm Immunserum sensibilisierte und gewaschene Pneumokokkenkultur ip. — 4<sup>h</sup> 15' Injektion. — 4<sup>h</sup> 20' 1. Entnahme: keine Phagocytose, frei reichlich Kokken. — 4<sup>h</sup> 40' 2. Entnahme: starke Phagocytose, frei wenig Kokken. — 5<sup>h</sup> 3. Entnahme: stärkste Phagocytose, frei keine Kokken. — Nach 18 Tagen mit 5 ccm Pferdeserum reinjiziert: schwerste Anaphylaxie.

Wie uns unsere Experimente lehren, verhindert die Phagocytose die Ausbildung der Anaphylaxie nicht. Diese Tatsache kann auf zweierlei Weise gedeutet werden:

1) Der Reaktionskörper wird von den Leukocyten produziert. Diese Annahme wäre nicht ganz unwahrscheinlich, da wir seit Pfeiffer und Marx wissen, daß das hämatopoëtische System zur Immunkörperproduktion in naher Beziehung steht.

2) Die von den Leukocyten mit den Bakterien aufgenommenen Antikörper werden wieder frei oder an die übrigen Körperzellen abgegeben. Wir möchten bei dieser Gelegenheit nur kurz der Hofmeisterschen Theorie der Verdauungsleukocytose gedenken.

Aus unseren Versuchen geht weiterhin hervor, daß die Immunantikörper den Antigencharakter nicht verlieren, wie dies von den Antikörpern des Normalserums durch die Untersuchungen von Altmann und Toyosumi schon bekannt war.

Uebertragungsversuche mit dem Serum einmal mit besetzten Pneumokokken vorbehandelter Meerschweinchen verliefen negativ. Es wurden daher Meerschweinchen dreimal hintereinander injiziert. Aus unseren Experimenten wollen wir folgendes anführen:

Tabelle III.

Eine Reihe von Meerschweinchen wurde am 1. VII. 12<sup>h</sup> mit 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. Am 2. VII. erhielten sie je eine halbe Kultur sensibilisierter Pneumokokken intraperitoneal. Die Besetzung erfolgte in der Art, daß der Bodensatz der bei 60° abgetöteten Kultur in 1 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt und mit 0,1 ccm des Pneumokokkenimmunserums Merck (200 IE. = 10 ccm) versetzt wurde.

2 Stunden bei 37° und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen blieb. Dann wurde er dreimal mit je 5 ccm NaCl-Lösung gewaschen.

8. VII. 12<sup>h</sup> 5 ccm NaCl-Lösung ip.

9. VII. 6<sup>h</sup> eine mit 0,2 ccm Immunserum sensibilisierte Kultur ip.

14. VII. 7<sup>h</sup> 5 ccm NaCl-Lösung ip.

15. VII. 7<sup>h</sup> eine abgetötete, mit 0,2 ccm Immunserum sensibilisierte Pneumokokkenkultur ip.

30. VII. erhielt ein Tier um 5<sup>1/2</sup><sup>h</sup> 5 ccm normales Pferdeserum ip. — 5<sup>3/4</sup><sup>h</sup> anaphylaktische Erscheinungen. — 6<sup>1/4</sup><sup>h</sup> schwer krank. Temperatur 33°. — 7<sup>h</sup> schwer krank. Temperatur 30,3°.

31. VII. früh tot aufgefunden.

Am 31. VII. 2 Tiere verblutet. Mit dem Serum ist folgender Versuch angestellt worden:

1. Meerschweinchen, 300 g.

31. VII. 7<sup>h</sup> 5 ccm anaphylaktischen Serums ip.

2. VIII. 4<sup>h</sup> 15' 5 ccm Pferdeserum ip. — 4<sup>h</sup> 25' schwere Anaphylaxie. Krämpfe. Temperatur 35,5°. Erholt sich.

2. Meerschweinchen, 300 g.

31. VII. 7<sup>h</sup> 2 ccm anaphylaktischen Serums ip.

2. VIII. 4<sup>h</sup> 20' 5 ccm Pferdeserum ip. — 4<sup>h</sup> 30' Anaphylaxie. Erholt sich.

Das Serum dieser Tiere wurde zu Erschöpfungsversuchen verwendet. Wir wollen zwei Versuche aus unseren Protokollen ausführlich wiedergeben:

5. VIII. 100 Löfflerserumkulturen von *Pneumococcus* Merck wurden in je 2 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt, 1 Stunde im Wasserbade auf 60° erhitzt, abzentrifugiert und in 12 ccm NaCl-Lösung aufgenommen.

A. 6 ccm dieser Suspension wurden mit 15 ccm NaCl-Lösung verdünnt, mit 3 Tropfen Toluol versetzt und 6 Stunden im Brutschrank stehen gelassen.

B. Die übrigen 6 ccm der Aufschwemmung wurden mit 400 IE. des Pneumokokkenimmunserums = 15 ccm versetzt und genau so lange unter Toluolzusatz bei 37° und nachher über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen wie Aufschwemmung A.

Am 6. VIII. wurden die Suspensionen zentrifugiert und die Bodensätze in je 15 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, in 3 Röhrchen je 5 ccm abgefüllt und 3mal gewaschen. (A = a, b, c, B = a' b' c'.) 10 ccm anaphylaktischen Serums wurden mit sensibilisierten Pneumokokken versetzt und 2 Stunden bei 37° gehalten. Eine gleiche Menge des anaphylaktischen Serums wurde mit nicht sensibilisierten Bakterien digeriert. Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit wiederum einerseits mit sensibilisierten, andererseits mit nicht sensibilisierten Bakterien versetzt, 2 Stunden bei Bruttemperatur, über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Am nächsten Morgen wurde der Erschöpfungsversuch mit dem letzten Drittel der sensibilisierten resp. nicht besetzten Bakterien wiederholt. Nach 2-stündigem Verweilen bei Bruttemperatur unter häufigem Umschütteln wurden die Pneumokokken abzentrifugiert und nach dem Verjagen des Toluols die Sera Meerschweinchen injiziert. Der Versuch nahm folgenden Verlauf:

1. Meerschweinchen, 300 g.
7. VIII. 5 ccm mit nicht sensibilisierten Pneumokokken behandelten anaphylaktischen Serums ip.
9. VIII.  $\frac{3}{4}$ h Temperatur 38,5°. — 4h 5 ccm Pferdeserum ip. — 4 $\frac{1}{4}$ h Unruhe, Kratzen. — 4 $\frac{3}{4}$ h liegt auf der Seite. — 5h krank, Temperatur 35°. Erholt sich.
2. Meerschweinchen, 300 g.
7. VIII. 2 ccm desselben anaphylaktischen Serums wie 1. ip.
9. VIII. 5h 5 ccm Pferdeserum ip. — 5h 15' schwere Anaphylaxie. — 5h 20' Krämpfe, Tod.
3. Meerschweinchen, 300 g.
7. VIII. 1 ccm desselben Serums wie 1. ip.
9. VIII.  $\frac{3}{4}$ h 5 ccm Pferdeserum ip. — 7 $\frac{1}{4}$ h liegt auf der Seite. — 7 $\frac{1}{2}$ h schwere Erscheinungen. — 8h Tod.
4. Meerschweinchen, 300 g.
7. VIII. 5 ccm des mit sensibilisierten Pneumokokken behandelten anaphylaktischen Serums ip.
9. VIII.  $\frac{3}{4}$ h Temperatur 38,5°. — 4h 5 ccm Pferdeserum ip. — 4 $\frac{1}{2}$ h 37,9°, keine Erscheinungen. —  $\frac{3}{4}$ h 5h keine Erscheinungen, 37,8°. — 5h 5 ccm Pferdeserum ip. — 5h 30' Unruhe, gestäubte Haare. — 6h liegt auf der Seite, 36,4°. Erholt sich.
5. Meerschweinchen, 300 g.
7. VIII. 2 ccm des anaphylaktischen Serums wie 4. ip.
9. VIII. 5h 5 ccm Pferdeserum ip. Temperatur 38°. — 5h 25' schwer krank. — 5h 30' Krämpfe, Tod.
6. Meerschweinchen, 300 g.
7. VIII. 0,5 ccm des anaphylaktischen Serums, wie 4. ip.
9. VIII.  $\frac{3}{4}$ h 5 ccm Pferdeserum ip. Temperatur 37,3°. — 7h schwer krank, totale Lähmung, Krämpfe. — 7 $\frac{1}{2}$ h erholt sich rasch. — 8h 37°, sitzt, krank.

Aus diesen und analogen Versuchen geht hervor, daß ein stark wirksames anaphylaktisches Meerschweinchen Serum durch eine mäßige Menge sensibilisierter Bakterien nicht erschöpft werden kann. Denn die Bakterienmenge ist trotz der großen Zahl verwendeter Kulturen wegen der geringen Wachstumsenergie des Pneumococcus nur eine ziemlich kleine. Wir stellten daher Erschöpfungsversuche an, in denen wir die Bakterienmenge und die Zahl der Erschöpfungen vermehrten, die Dauer derselben verlängerten und schwächeres anaphylaktisches Serum anwendeten. Ausführlicher teilen wir folgenden Versuch mit:

100 Kulturen von Pneumococcus Merck wurden in je 2 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt, bei 60° 1 Stunde erhitzt, abzentrifugiert und die Bodensätze von je 3 Kulturen in 0,6 ccm des Pneumokokkenimmunserums

suspendiert, 4 Stunden bei 37° und 20 Stunden bei Zimmertemperatur unter häufigem Umschütteln digeriert. 100 Kulturen nicht sensibilisiert, aber sonst genau so behandelt.

Nachher abzentrifugiert und 3mal gewaschen.

20. VIII. 1) 5 ccm anaphylaktischen Meerschweinchenserums wurden mit 21 sensibilisierten Pneumokokkenkulturen versetzt, unter häufigem Umschütteln 2 Stunden bei 37° und dann 22 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Starke Agglutination. — 2) 4 ccm desselben anaphylaktischen Serums wurden mit nicht besetzten Bakterien versetzt, sonst aber genau so behandelt wie 1). Agglutination.

Dieselbe Prozedur wird am 21. VIII. und 22. VIII. wiederholt. Keine Agglutination, nur Sedimentierung.

Am 23. VIII. wird die abzentrifugierte Flüssigkeit zum letzten Male mit 21 Kulturen versetzt und 4 Stunden bei 37° digeriert, abzentrifugiert, Toluol verjagt und die Sera zum Tierversuch verwendet.

1. Meerschweinchen, 300 g.

23. VIII. 6<sup>b</sup> 2 ccm des mit nicht sensibilisierten Bakterien erschöpften anaphylaktischen Meerschweinchenserums ip.

25. VIII. 8<sup>b</sup> 5 ccm Pferdeserum ip. — 8<sup>b</sup> 19' schwere Erscheinungen. — 8<sup>b</sup> 45' Tod.

2. Meerschweinchen, 300 g.

23. VIII. 6<sup>b</sup> 2 ccm des Serums wie 1. ip.

25. VIII. 8<sup>b</sup> 5 ccm Pferdeserum ip. — 8<sup>b</sup> 15' Anaphylaxie, liegt auf der Seite. — 9<sup>b</sup> 30' krank. Erholt sich.

3. Meerschweinchen.

23. VIII. 6<sup>b</sup> 2 ccm des mit sensibilisierten Bakterien erschöpften anaphylaktischen Serums ip.

25. VIII. 8<sup>b</sup> 5 ccm Pferdeserum ip. — 8<sup>b</sup> bis 10<sup>b</sup> 15' keine Erscheinungen, Temperatur 38°.

4. Meerschweinchen.

23. VIII. 6<sup>b</sup> 2 ccm desselben Serums wie 3. ip. — 8<sup>b</sup> 5 ccm Pferdeserum ip. — 8<sup>b</sup> bis 10<sup>b</sup> 15' keine Erscheinungen, Temperatur 38°.

Es gelingt demnach, wie aus diesem und analogen Versuchen hervorgeht, ein anaphylaktisches Serum durch das analoge Antigen unwirksam zu machen. Der anaphylaktische Reaktionskörper verhält sich wie ein Antikörper sensu strictiori. Hervorzuheben wäre nur, daß die Erschöpfung nicht leicht zu erzielen ist und jedenfalls nicht mit derjenigen bei Hämolysinen etc. verglichen werden kann. Wir wollen nur auf ein analoges Verhalten aufmerksam machen, das präzipitierende Sera in bezug auf ihre Cytolyse verstärkende Wirkung zeigen. Auch diese Eigenschaft läßt sich, wie die interessanten Untersuchungen von Friedberger und seiner Mitarbeiter zeigten, durch Behandlung

mit sensibilisierten Blutkörperchen nicht leicht aufheben. Vielleicht liegt der Grund darin, daß man hier nach dem Schema Ambozeptor-Zelle vorgegangen ist. Da hier aber das Antigen bereits gebunden ist, da es auch in nicht zu großer Konzentration vorhanden sein kann, und da die wirksamen Stoffe vielleicht ein ähnliches Verhalten wie die Präzipitine zeigen oder mit denselben gar identisch sind (Friedberger, Doerr und Russ), so muß die Versuchsanordnung demgemäß getroffen werden.

Wir haben bis jetzt nicht Gelegenheit gehabt, ein präzipitierendes Meerschweinchenserum zu untersuchen. Ein entsprechender Versuch mit präzipitierendem Kaninchenserum zeigte, daß sich dieses durch besetzte Bakterien seiner Präzipitine berauben läßt. Auf Grund unserer bisherigen Experimente können wir aber die Frage, ob die anaphylaktischen Antikörper und die Präzipitine identisch sind, nicht entscheiden.

#### Zusammenfassung.

I. Mit sensibilisierten Bakterien läßt sich beim Meerschweinchen eine Ueberempfindlichkeit gegen das verwendete Serum erzeugen.

II. Die Phagocytose der besetzten Keime verhindert die Ausbildung der Anaphylaxie nicht.

III. Die Immunantikörper wirken antigen.

IV. Anaphylaktisches Meerschweinchenserum kann durch besetzte Bakterien erschöpft werden. Der Reaktionskörper verhält sich also anderen Antikörpern analog.

V. Präzipitierendes Kaninchenserum wird durch Behandlung mit sensibilisierten Keimen seiner ausflockenden Fähigkeit beraubt.

#### Literatur.

- Otto, v. Leuthold-Gedenkschrift, Bd. 1, 1906.  
 — Münchner med. Wochenschr., 1907.  
 Braun, Münchner med. Wochenschr., 1909.  
 Friedberger, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, 1909.  
 Doerr und Russ, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, 1909.  
 Pfeiffer und Friedberger, Centralbl. f. Bakt., 1903.  
 Bail und Tsuda, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, 1909.  
 Pfeiffer und Marx, Zeitschr. f. Hyg., 1898.  
 Friedberger und Moreschi, Centralbl. f. Bakt., 1908.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Statens Seruminstitut Kopenhagen.]

**Untersuchungen über die Blutanaphylaxie und die Möglichkeit ihrer Anwendung in der Gerichtsmedizin <sup>1)</sup>.**

Von Dr. Oluf Thomsen.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. September 1909.)

In einer früheren Arbeit <sup>2)</sup> beschäftigte ich mich mit der Spezifität der Serumanaphylaxie und mit der Verwendbarkeit der Erscheinung der Anaphylaxie in der gerichtsärztlichen Praxis zur Differenzierung von Menschen- und Tierblut.

Als Resultat der Arbeit ergab sich, daß man durch Sensibilisierung von Meerschweinchen mittels wässrigen Extraktes aus sogar mehrere Monate altem Blut (an Lumpen u. ä.) die Tiere hochgradig anaphylaktisch für das homologe Serum machen könne. Die Serumanaphylaxie erwies sich als eine wenn auch nicht absolute, so doch in ziemlich hohem Maße spezifische, so daß schwere Anaphylaxiesymptome nur durch das homologe oder damit sehr nahe verwandte Sera hervorgerufen wurden. Gleichzeitig mit mir teilte P. Uhlenhuth <sup>3)</sup> mit, daß auch er ähnliche Untersuchungen <sup>4)</sup> angestellt und im wesentlichen dieselben Resultate erzielt habe. Uhlenhuth betrachtet die Anaphylaxieprobe als umständlicher und weniger exakt als die Präzipitationsmethode zur Identifizierung von Blutflecken. Da aber zur Sensibilisierung nur minimale Eiweißmassen erforderlich sind, so kann man durch Anaphylaxie die Art von gekochtem Fleisch auch in solchen Fällen nachweisen, wo die Präzipitationsmethode infolge der vollständigen Destruktion der präzipitablen Eiweißes nicht anwendbar ist.

Auch Sleeswijk <sup>5)</sup> teilte in einer kurzen Notiz mit, daß er zu ähnlichem Ergebnis gelangt sei.

Da sich in meiner früheren Arbeit ergeben hatte, daß Extrakt aus eingetrockneten Blutflecken Anaphylaxie für das

---

1) Als Vortrag in der biologischen Gesellschaft zu Kopenhagen am 6. Mai 1909 gehalten.

2) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Bd. 1, 1909, H. 6, p. 741.

3) Ebenda p. 770.

4) Schon früher in Kürze mitgeteilt in der Deutsch. militärärztl. Zeitschr., 1909, H. 2.

5) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Bd. 2, 1909, H. 1, p. 132.



betreffende Serum hervorrief, war es von Interesse zu untersuchen, ob auf die gleiche Art sensibilisierte Meerschweinchen auch für die cellulären Elemente des Blutes, insbesondere für die roten Blutkörperchen, anaphylaktisch seien.

Wie aus der nachstehenden Untersuchung (Tabelle I) ersichtlich, zeigte sich, daß das der Fall ist.

Tabelle I.

Sensibilisiert mit Blutfleck von	Nach Verlauf von 16 Tagen wurde injiziert	Ergebnis
Pferd	1 ccm Pferdeblutkörperchen in 2 ccm Wasser aufgelöst	Schwere Symptome; starb nach 38 Min.
Pferd	5 ccm Pferdeserum	Schwere Symptome; blieb am Leben
Ziege	1 ccm Ziegenblutkörperchen in 2 ccm Wasser aufgelöst	Schwere Symptome; blieb am Leben
Ziege	5 ccm Ziegenserum	Schwere Symptome; starb nach 46 Min.
Mensch	1 ccm Menschenblutkörperchen in 2 ccm Wasser aufgelöst	Schwere Symptome; blieb am Leben
Mensch	5 ccm Menschenserum	Schwere Symptome; blieb am Leben

Bei allen diesen sowie den folgenden Untersuchungen mittels wässrigen Extraktes aus Blutflecken sensibilisierten Tieren wurde bei der ersten (sensibilisierenden) Injektion 1 ccm des Extraktes gegeben (1 ccm von dem ganz mit Blut getränkten Zeug, enthaltend ca.  $\frac{1}{10}$  ccm Blut + 5 ccm 0,9-proz. Kochsalzlösung). Die zur zweiten Injektion verwendeten<sup>1)</sup> Blutkörperchen waren sechsmal ausgewaschen. Von den zentrifugierten Blutkörperchen wurde jedem Tier 1 ccm in 2 ccm Wasser aufgelöst gegeben. Nach einstündigem Stehenlassen in Wasser bei 37° wurde die Blutlösung mit NaCl isotonisch gemacht. Das zur zweiten Injektion verwendete Serum wurde erst während  $\frac{1}{4}$  Stunden auf 56° erwärmt.

Die durch die zweite Injektion hervorgerufenen Symptome waren die für die Anaphylaxie typischen (Unruhe, Zucken, Schwäche, Paresen, Dyspnoë, Temperaturerniedrigung, Krämpfe,

1) Hier sowie in den folgenden Versuchen hat die zentrifugierte Blutkörperchenemulsion eine Dichte von ca. 25 Millionen rote Blutkörperchen per Quadratmillimeter.

Tod) und ganz gleich bei Benutzung von Serum und aufgelösten Blutkörperchen zur zweiten Injektion.

Weiter zeigte sich nun, daß die Anaphylaxie für Serum und die Anaphylaxie für Blutkörperchen ganz unabhängig voneinander bestehen. Wurden die Tiere nur mit Serum sensibilisiert, so waren sie nur für das betreffende Serum überempfindlich, nicht aber für die homologen Blutkörperchen; umgekehrt ließ sich aber mit von Serum ganz befreiten Blutkörperchen nur Anaphylaxie für Blutkörperchen, aber nicht für Serum hervorrufen.

Die nachstehenden Untersuchungen (Tabellen II—IV) werden dies veranschaulichen:

Tabelle II.  
15 Meerschweinchen wurden mit Serum sensibilisiert <sup>1)</sup>.

	Sensibilisiert mit	Zahl der Tage zwischen erster und späteren Injektionen	Spätere Injektion	Ergebnis
1.	$\frac{1}{550}$ ccm antitox. Pferdeserum + 0,23 ccm Toxin	41	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		42	5 ccm Pferdeserum	Schwere Symptome; blieb am Leben
2.	$\frac{1}{300}$ ccm Pferdeserum + 0,23 ccm Toxin	17	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		18	5 ccm Pferdeserum	Leichte Symptome
3.	$\frac{1}{400}$ ccm Pferdeserum + 0,23 ccm Toxin	18	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		19	5 ccm Pferdeserum	† 76 Min. n. d. Inj.
4.	$\frac{1}{300}$ ccm Pferdeserum + 0,24 ccm Toxin	18	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		19	5 ccm Pferdeserum	† nach 22 Min.
5.	$\frac{1}{300}$ ccm Pferdeserum + 0,24 ccm Toxin	14	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Etwas stumpf, sonst keine Symptome
		15	5 ccm Pferdeserum	† nach 32 Min.
6.	$\frac{1}{400}$ ccm Pferdeserum + 0,24 ccm Toxin	63	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		64	5 ccm Pferdeserum	† nach 34 Min.
7.	$\frac{1}{10}$ ccm Ehrlichs Testserum (Pferd) + 0,24 ccm Toxin	63	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		64	5 ccm Pferdeserum	† 43 Min. n. d. Inj.

1) Die 10 ersten Tiere waren früher benutzte Diphtherietiere.

	Sensibilisiert mit	Zahl der Tage zwischen erster und späteren Injektionen	Spätere Injektion	Ergebnis
8.	$\frac{1}{10}$ ccm Ehrlichs Testserum (Pferd) + 0,23 ccm Toxin	63	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		64	5 ccm Pferdeserum	Schwere Symptome; blieb am Leben.
9.	10 ccm Pferdeserum (diphtherieantitox.)	90	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		91	5 ccm Pferdeserum	Leichte Symptome
10.	10 ccm Pferdeserum (diphtherieantitox.)	41	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		42	5 ccm Pferdeserum	Schwere Symptome; blieb am Leben
11.	$\frac{1}{150}$ ccm Menschenserum	16	1 ccm Menschenblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		16 + 6 <sup>h</sup>	5 ccm Menschenserum	† nach 64 Min.
12.	$\frac{1}{150}$ ccm Menschenserum	16	1 ccm Menschenblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Etwas stumpf, sonst keine Symptome
		16 + 6 <sup>h</sup>	5 ccm Menschenserum	† nach 30 Min.
13.	$\frac{1}{200}$ ccm Menschenserum	16	1 ccm Menschenblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		17	5 ccm Menschenserum	Schwere Symptome
14.	$\frac{1}{100}$ ccm Menschenserum	20	1 ccm Menschenblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Keine Symptome
		20 + 2 <sup>h</sup>	5 ccm Menschenserum	† nach 18 Min.
15.	$\frac{1}{100}$ ccm Schafserum	16	1 ccm Schafsblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Etwas stumpf; sonst keine Symptome
		17	5 ccm Schafserum	Leichte Symptome

Es ist hier zu erwähnen, daß mit Blutkörperchen (Mensch) sensibilisierte Tiere ebensowenig für Frauenmilch wie für Serum anaphylaktisch waren, daß aber die Tiere, denen bei der ersten Injektion Serum gegeben worden war, auch auf Milch anaphylaktisch reagierten.

Zu der Tatsache, daß die Serum- und Blutkörperchen-anaphylaxie unabhängig voneinander bestehen, stimmt weiterhin, daß mit Extrakt aus Blutflecken sensibilisierte Tiere, die den anaphylaktischen Anfall nach der Injektion des homologen Serums überlebten, nicht antianaphylaktisch sind gegen die

Tabelle III.

10 Meerschweinchen wurden mit aufgelösten, 8mal gewaschenen Blutkörperchen sensibilisiert. Jedes Tier wurde sensibilisiert mit 1 ccm der Blutlösung: 0,1 gewaschene und zentrifugierte Blutkörperchen + 10 ccm. destillierten Wassers, nach der Auflösung mit NaCl isotonisch gemacht.

Sensibilisiert mit	Zahl der Tage zwischen erster und späteren Injektionen	Spätere Injektion	Ergebnis
Schafsblutkörperchen	14	5 ccm Schafserum	Etwas stumpf, sonst keine Symptome † nach 62 Min.
	15	1 ccm Schafsblutkörperchen + 2 ccm Wasser	
Schafsblutkörperchen	14	5 ccm Schafserum	Keine Symptome Leichte Symptome
	15	1 ccm Schafsblutkörperchen + 2 ccm Wasser	
Schafsblutkörperchen	14	5 ccm Schafserum	Keine Symptome Leichte Symptome
	16	1 ccm Schafsblutkörperchen + 2 ccm Wasser	
Pferdeblutkörperchen	14	5 ccm Pferdeserum	Keine Symptome Leichte Symptome
	15	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	
Pferdeblutkörperchen	14	5 ccm Pferdeserum	Keine Symptome † nach 56 Min.
	15	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	
Pferdeblutkörperchen	15	5 ccm Pferdeserum	Keine Symptome Schwere Symptome; blieb am Leben.
	16	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	
Ochsenblutkörperchen	16	5 ccm Ochsenserum	Etwas stumpf Schwere Symptome; blieb am Leben
	17	1 ccm Ochsenblutkörperchen + 2 ccm Wass.	
Ochsenblutkörperchen	16	5 ccm Ochsenserum	Keine Symptome Schwere Symptome; blieb am Leben
	17	1 ccm Ochsenblutkörperchen + 2 ccm Wass.	
Aalblutkörperchen	16	2 ccm Aalserum <sup>1)</sup>	Etwas stumpf † nach 40 Min.
	17	1 ccm Aalblutkörperchen + 2 ccm Wasser	
Aalblutkörperchen	16	2 ccm Aalserum <sup>1)</sup>	Etwas stumpf Schwere Symptome; blieb am Leben
	17	1 ccm Aalblutkörperchen + 2 ccm Wasser	

homologen Blutkörperchen. Die nachstehende Untersuchung wird dies zeigen (Tabelle IV).

1) Während 2 $\frac{1}{2}$  Stunden auf 56° erwärmt.

Tabelle IV.

Sensibilisiert mit	Zahl der Tage zwischen erster und späteren Injektionen	Spätere Injektion	Ergebnis
Extrakt aus Schafsblutfleck	15	5 ccm Schafserum	Schwere Symptome ; bleibt am Leben
	26	1 ccm Schafsblutkörperchen + 2 ccm Wasser	† nach 18 Min.
Extrakt aus Pferdeblutfleck	16	5 ccm Pferdeserum	Schwere Symptome ; bleibt am Leben
	70	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	† nach 58 Min.
Extrakt aus Pferdeblutfleck	48	5 ccm Pferdeserum	Schwere Symptome ; bleibt am Leben
	38	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	† nach 67 Min.
Extrakt aus Menschenblutfleck	16	5 ccm Menschenserum	Leichte Symptome
	36	1 ccm Menschenblutkörperchen + 2 ccm Wass.	Schwere Symptome ; bleibt am Leben
Extrakt aus Ziegenblutfleck	14	5 ccm Ziegenserum	Schwere Symptome ; bleibt am Leben
	32	1 ccm Ziegenblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Schwere Symptome ; bleibt am Leben

Während die meisten Sera eine mehr oder minder starke unmittelbare Giftigkeit für Meerschweinchen besitzen, sind die Blutkörperchenlösungen in den bei den Untersuchungen zur Anwendung gelangenden Mengen nahezu indifferent für frische Meerschweinchen. Wie durch die von Uhlenhuth, H. Pfeiffer, Doerr und Raubitschek sowie von mir angestellten Untersuchungen festgestellt worden ist, kann diese unmittelbare Giftigkeit heterologen Serums durch eine Erwärmung von verhältnismäßig kurzer Dauer auf 56° destruiert werden, wodurch die mittelbare Giftigkeit für homolog anaphylaktische Meerschweinchen nicht wahrnehmbar abgeschwächt wird. Während z. B. 2—5 ccm nicht erwärmtes Ochsen Serum intraperitoneal injiziert meistens im Verlauf von 8—24 Stunden ein Meerschweinchen töten, ist die Wirkung von 2—5 ccm Ochsenblutkörperchen (aufgelöst) sehr gering, wenn das Tier vorher nicht sensibilisiert worden ist. Das gleiche gilt von den Blutkörperchenlösungen von Schaf, Ziege, Pferd, Mensch, Huhn, Taube, Schwein — unter den bei meinen Untersuchungen herangezogenen Blutarten erwiesen nur Aal- und

Kaninchenblutkörperchen sich als einigermaßen toxisch für frische Meerschweinchen. So erzeugte 1 ccm Aalblutkörperchen einige Schwäche und leichte Temperaturerniedrigung an dem Meerschweinchen. Diese Symptome, die anders als die Anaphylaxiesymptome, erst etwa 1 Stunde nach der Injektion auftreten und einige Stunden andauern, um dann gänzlich zu verschwinden, sind nur gering im Vergleich zu der Wirkung einer intraperitonealen Injektion von Aalserum. Während  $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{100}$  ccm Aalserum meistens den Tod eines Meerschweinchens herbeiführt, war 1 ccm Blutkörperchen nur von vorübergehender Wirkung auf die Versuchstiere. Da die benutzten Blutkörperchen zentrifugiert und 8mal mit 8mal so großem Volumen Chlornatriumlösung ausgewaschen worden waren, so beruht die Giftigkeit der Blutkörperchen schwerlich auf einem nicht entfernten Rest von Serum, sondern auf den Zellen selbst.

Auch Kaninchenblutkörperchen erwiesen sich als unmittelbar giftig für Meerschweinchen. Aufgelöste Blutkörperchen (1 ccm) rufen stets Schwäche und Temperaturerniedrigung an den Versuchstieren hervor. Nach Verlauf von wenigen Stunden sind die Symptome wieder verschwunden. Die Erwärmung der Blutkörperchen auf  $56^{\circ}$  während  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  Stunden hob diese Giftigkeit nicht auf. In meiner früheren Arbeit ergab sich, daß Kaninchenserum eine nur wenig ausgesprochene Anaphylaxie bei Meerschweinchen hervorruft; das gleiche gilt für Kaninchenblutkörperchen, wie aus den in der Tabelle V dargestellten Untersuchungen ersichtlich ist.

Tabelle V.

8 Meerschweinchen wurden mit aufgelösten Kaninchenblutkörperchen sensibilisiert (1 ccm der Lösung 0,1 ccm Blutkörperchen + 10 ccm dest. Wassers).

Zahl der Tage zwischen erster und zweiter Injektion	Zweite Injektion	Ergebnis
14	1 ccm aufgelöste Blutkörp.	leichtes Zucken, schlaff
16	1 " " "	schlaff
16	1 " " "	unerhebl. Zucken, schlaff
18	2 " " "	schlaff
18	2 " " "	schlaff
20	2 " " "	leichtes Zucken, schlaff
22	2 " " "	schlaff
30	2 " " "	schlaff

Keines der Tiere starb, einige hatten leichtes Zucken, wie man es im ersten Stadium der Anaphylaxiesymptome sieht; bei 6 der Tiere stellte sich noch ein Niedergang der Temperatur ein, indem sie sich um  $0,5-2^{\circ}$  unter die Normaltemperatur ( $38,5-39,5$ ) erniedrigte. Diese Erniedrigung der Temperatur als Anaphylaxiesymptome aufzufassen, wäre unzweifelhaft falsch. H. Pfeiffer<sup>1)</sup> berichtete kürzlich, daß sich bei sensibilisierten Meerschweinchen, denen bei der zweiten Injektion ein verhältnismäßig geringes Quantum ( $0,5$  ccm) homologen Serums gegeben wurde, als einziges Anaphylaxiesymptom eine — oft erhebliche — Erniedrigung der Temperatur einstellen kann. Meine Untersuchungen ermöglichen mir nicht die Entscheidung, welcher Wert diesem isolierten Symptom beizumessen ist, auf das ich später noch eingehen werde. Was die Temperaturerniedrigung bei den Tieren der Tabelle V betrifft, so zeigten zur Kontrolle herangezogene Tiere, denen dasselbe Quantum Kaninchenblutkörperchen gegeben wurde, ganz ähnliche Schwächesymptome und entsprechende Temperaturverhältnisse.

Während die Anaphylaxie für artfremde Sera zum Gegenstand der Untersuchungen zahlreicher Forscher gemacht worden ist, liegt über die Anaphylaxie für Zellen und Zellenbestandteile nur noch wenig vor. Am meisten sind in dieser Beziehung die Erythrocyten untersucht worden. Verschiedene Forscher haben die Beobachtung gemacht, daß Kaninchen eine wiederholte intravenöse Injektion fremder Blutkörperchen schlecht vertragen. Wolff-Eisner<sup>2)</sup> brachte diese geringere Resistenz gegenüber wiederholten Injektionen fremder Zellen mit der Auslösung von Endotoxinen infolge der Ausbildung von spezifischen Cytolysinen in Verbindung. U. Friedemann<sup>3)</sup> untersuchte kürzlich die erhöhte Empfindlichkeit der Kaninchen gegenüber einer wiederholten intravenösen Injektion von Erythrocyten, und betrachtete die dadurch hervorgerufenen Symptome, die oft mit dem Tod enden, als eine Folge der Anaphylaxie. Da aber Friedemanns Untersuchungen, wie

---

1) Wien. klin. Wochenschr. 1909, No. 1.

2) Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Origin., Bd. 37.

3) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Bd. 2, 1909, No. 5.

auch vom Verf. selbst hervorgehoben wurde, zeigen, daß der „anaphylaktische Reaktionskörper“ mit dem hämolytischen Ambozeptor wahrscheinlich identisch ist, so ist es sehr zu bezweifeln, ob man die bei den Kaninchen auftretenden Krankheitserscheinungen mit Recht der Anaphylaxie gleichstellen kann. A. Coca<sup>1)</sup>, der gleichfalls fand, daß Kaninchen oft in unmittelbarer Folge einer wiederholten intravenösen Injektion von Erythrocyten sterben, beobachtete als Todesursache eine Verstopfung der Gefäße in dem kleinen Kreislauf durch agglutinierte Erythrocyten; es sind dies pathologisch-anatomische Veränderungen, die die anaphylaxieähnlichen Symptome (Dyspnoë, Kollaps, terminale Krämpfe) erklären können, zugleich aber es als sehr unsicher erscheinen lassen, ob sie mit der wirklichen Anaphylaxie in Verbindung stehen.

Bei meinen Versuchen hingegen handelt es sich unzweifelhaft um eine der Serumanaphylaxie ganz analoge Anaphylaxie für Erythrocyten. Das ist zu schließen aus der geringen Menge von Blut, die genügte, um die Tiere für eine wiederholte intraperitoneale Injektion überempfindlich zu machen, sowie aus dem Umstand, daß Tiere, die die zweite Injektion von Blutkörperchen überlebten, gegen eine erneute Injektion anti-anaphylaktisch waren. In einigen Fällen untersuchte ich das Serum von mit Blutkörperchen (Pferd, Schaf, Mensch) sensibilisierten Meerschweinchen, fand aber nie hämolytische Ambozeptoren für die verwendeten Blutkörperchen noch Agglutinine in größerer Konzentration, als man es normalerweise finden kann.

Die obigen Untersuchungen zeigen, daß eine ausgesprochene Spezifität der Anaphylaxie für Erythrocyten, sowie für Serum der gleichen Tierart besteht. Eine andere Frage war es, ob die Erythrocytenanaphylaxie auch artspezifisch sei. Um dies zu entscheiden, wurde eine Anzahl von Meerschweinchen gleichen Alters und von gleichem Gewicht mittels wässerigen Extraktes aus eingetrockneten Blutflecken von verschiedenen Tieren sensibilisiert; das Resultat ist aus der Tabelle VI ersichtlich:

---

1) Virchows Arch., Bd. 196, 1909, H. 1.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. III.



Tabelle VI.

Jedes Tier wurde mit 1 ccm wässrigem Extrakt (1 gcm großer Zeugfetzen, enthaltend ca.  $\frac{1}{10}$  ccm Blut, extrahiert mit 5 ccm NaCl-Lösung aus 6—8 Monate alten Blutflecken [auf Leinwand]) sensibilisiert.

Sensibilisiert mit	Zahl der Tage nach der Sensibilisierung	Injektion von	Ergebnis
Pferdeblut	14	1 ccm Pferdeblutkörperchen (aufgelöst)	† nach 18 Min.
Pferdeblut	14	1 „ Ziegenblutkörperchen (aufgelöst)	Leichtes Jucken
	16	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	17	1 „ Pferdeblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben
Pferdeblut	16	1 „ Hühnerblutkörperchen (aufgelöst)	Leichte Symptome
	18	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	20	1 „ Pferdeblutkörperchen (aufgelöst)	Leichte Symptome
Hühnerblut	16	1 „ Schafsblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	17	1 „ Pferdeblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	18	1 „ Hühnerblutkörperchen (aufgelöst)	† nach 30 Min.
Hühnerblut	18	1 „ Hühnerblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben
Hühnerblut	14	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Leichte Symptome
	15	1 „ Ziegenblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	16	1 „ Hühnerblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben
Menschenblut	15	1 „ Ziegenblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	16	1 „ Hühnerblutkörperchen (aufgelöst)	Leichte Symptome
	18	1 „ Schafsblutkörperchen (aufgelöst)	Leichte Symptome, etwas stumpf
	20	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Leichte Symptome
Menschenblut	20	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	† nach 68 Min.
Menschenblut	16	1 „ Hühnerblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	17	1 „ Pferdeblutkörperchen (aufgelöst)	Unerhebliches Jucken
Menschenblut	19	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben

Sensibilisiert mit	Zahl der Tage nach der Sensibilisierung	Injektion von	Ergebnis
Ziegenblut	14	1 ccm Pferdeblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	16	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	24	1 „ Ziegenblutkörperchen (aufgelöst)	† nach 22 Min.
Ziegenblut	14	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Leichte Symptome
	25	1 „ Taubenblutkörperchen (aufgelöst)	† nach 44 Min.
Ziegenblut	14	1 „ Pferdeblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	15	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	17	1 „ Schafsblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben
	22	1 „ Ziegenblutkörperchen (aufgelöst)	† nach 52 Min.
Taubenblut	20	1 „ Ziegenblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	25	1 „ Taubenblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben
Taubenblut	18	1 „ Hühnerblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben
	20	1 „ Schafsblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	26	1 „ Taubenblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben
Schafsblut	14	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Leichtes Jucken
	16	1 „ Ziegenblutkörperchen (aufgelöst)	Leichte Symptome
	17	1 „ Schafsblutkörperchen (aufgelöst)	Leichte Symptome
Schafsblut	16	1 „ Ziegenblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben
	18	1 „ Taubenblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	19	1 „ Menschenblutkörperchen (aufgelöst)	Keine Symptome
	20	1 „ Schafsblutkörperchen (aufgelöst)	† nach 70 Min.
Schafsblut	20	1 „ Taubenblutkörperchen (aufgelöst)	Unerhebliche Symptome
	24	1 „ Schafsblutkörperchen (aufgelöst)	Schwere Sympt.; blieb am Leben

38\*

Es zeigte sich also eine Artspezifität der Erythrocyten-anaphylaxie, die derjenigen der Serumanaphylaxie ganz gleicht, indem heterologe Blutkörperchen nur schwache oder gar keine Anaphylaxiesymptome auslösten, das homologe oder damit nahe verwandte Blut dagegen meistens das typische, schwere Krankheitsbild ergab, das oft im Verlauf von kurzer Zeit mit dem Tod endete. Mehrere der Tiere waren jedoch — besonders im Vergleich zu den Verhältnissen bei der Serumanaphylaxie — auffallend refraktär, auch gegen das homologe Blut. In der Untersuchungsreihe der Tabelle VI zeigte sich ferner ein beachtenswerter Ausnahmefall: ein mit Ziegenblut sensibilisiertes Meerschweinchen reagierte 25 Tage später auf eine Injektion von Taubenblutkörperchen mit sehr starken Anaphylaxiesymptomen (Zucken, Parese, Dyspnoë, Temperaturerniedrigung [um 2°], terminalem Springkrampf), die nach Verlauf von 44 Min. einen tödlichen Ausgang hatten. Obwohl dieser eine Fall von den übrigen Ergebnissen der Versuche mit der Anaphylaxie, sowohl für Serum wie für Erythrocyten ganz und gar verschieden ist, und daher als eine seltene Entgleisung zu betrachten sein dürfte, so muß er doch zu großer Vorsicht mahnen bei der Anwendung der Anaphylaxiemethode zur Entscheidung von wichtigen mediko-forensischen Fragen. In dem vorliegenden Fall ist es möglich, daß die Injektion von Menschenblut 14 Tage nach der Sensibilisierung (mit Ziegenblut) einen gewissen Einfluß auf die eigentümliche Wirkung des 11 Tage später injizierten Taubenblutes gehabt haben kann. Wo sonst heterologes Blut zwischen die Sensibilisierung und die Injektion homologer Erythrocyten eingeschoben wurde, wurde dadurch freilich keine Störung verursacht; vielleicht beruht das aber auf dem Umstand, daß die Intervalle zwischen den verschiedenen Injektionen kürzer waren. Bislang noch fehlt mir das erforderliche Material zur Beurteilung der Bedeutung dieser Erscheinung; daß Ziegenblut im allgemeinen keine besondere Anaphylaxie für Taubenblut ergibt, wurde durch zu diesem Zweck angestellte Untersuchungen erwiesen.

Ergeben somit meine Untersuchungen, daß der Methode — wenigstens bei der von mir angewandten Technik — nur beschränkter Wert beizumessen ist, so bin ich doch der An-

sicht, daß die Anwendung der Anaphylaxie sowohl für Serum wie für Erythrocyten in der Gerichtsmedizin als ergänzende Methode nützlich sein wird, und in diesem Zusammenhange ist es von Interesse, eine Aeüßerung aus der ausgezeichneten Abhandlung von H. Sachs<sup>1)</sup>, „Hämolysine und Cytolysine des Blutserums“ zu zitieren: „Ich muß überdies auch an dieser Stelle besonders hervorheben, daß die biologischen Methoden — Präzipitation- und Komplementbindung — nicht die Anwesenheit von Blut zu diagnostizieren erlauben, sondern nur die Anwesenheit von eiweißartigen Bestandteilen bestimmter Herkunft. Sie sind eben Eiweißdifferenzierungsmethoden im Sinne Wassermanns.“ Hat man in einem Fleck auf mikrochemischem oder spektroskopischem Wege die Anwesenheit von Blut und durch eine biologische Untersuchung Eiweiß von einer bestimmten Tierart nachgewiesen, so kann man je nach den vorliegenden Umständen mit mehr oder minder großer Wahrscheinlichkeit über die Zusammengehörigkeit urteilen. „Für die gerichtliche Medizin bleibt es daher ein Desiderat, eine Methode aufzufinden, welche gleichzeitig für Blut als solches und für die Herkunft von einer bestimmten Tierart spezifisch ist.“

In der Erythrocytenanaphylaxie vereinigen sich in Wirklichkeit beide, sowohl die Artspezifizität als die Spezifizität für Blut. Die letztere ist, wie unten ausführlicher auseinander-gesetzt, wenigstens größtenteils eine Wirkung des Hämoglobins.

In der Praxis dürfte es nur ausnahmsweise sich so treffen, daß Blutflecke von ausgewaschenen, von Serum befreiten Blutkörperchen herrühren; in dem Laboratorium dagegen kommt es leicht vor, und unter Umständen wird es von Bedeutung sein, dieses, sowie die Art der Blutkörperchen nachweisen zu können. Ein solcher Nachweis wird indessen sehr schwierig zu liefern sein auf anderem Wege als durch den Nachweis eines Sensibilisins für eine bestimmte Erythrocytenart und gleichzeitiger Abwesenheit eines Sensibilisins für das homologe Serum.

In der nachstehenden Tabelle (VII) ist eine Untersuchungsreihe verzeichnet, aus der hervorgeht, daß sich mit einer

---

1) Kraus und Levaditis Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung, Bd. 2, 1909.

Lösung von reinem, umkristallisiertem<sup>1)</sup> Hämoglobin eine spezifische Anaphylaxie für die angewandte Hämoglobinart, sowie für die betreffenden Erythrocyten hervorrufen läßt, sowie daß man mit aufgelösten Erythrocyten für reines Hämoglobin sensibilisieren kann. Uebrigens haben schon 1907 Rosenau und Anderson<sup>2)</sup> nachgewiesen, daß eine Hämoglobinlösung (aufgelöste rote Blutkörperchen) Anaphylaxie erzeugen kann.

Tabelle VII.

Zur Sensibilisierung wurde angewandt 0,3 mg Hämoglobin, zur zweiten Injektion 20 mg, in 0,9-proz. NaCl-Lösung aufgelöst.

Sensibilisiert mit	Zahl der Tage nach der Sensibilisierung	Injektion von	Ergebnis
Pferdehämoglobin	14	Pferdehämoglobin	Schwere Sympt., blieb am Leben
dgl.	14	Hundehämoglobin	Keine Symptome
	15	Pferdehämoglobin	† nach 11 Min.
dgl.	15	Hundehämoglobin	Etwas stumpf
	18	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	Schwere Sympt., blieb am Leben
dgl.	16	Hundehämoglobin	Leichtes Zucken
	18	1 ccm Pferdeblutkörperchen + 2 ccm Wasser	† nach 30 Min.
$\frac{1}{100}$ ccm aufgelöste Pferdeblutkörper.	16	Hundehämoglobin	Leichtes Zucken
	17	Pferdehämoglobin	Schwere Sympt., blieb am Leben
Hundehämoglobin	14	Pferdehämoglobin	Keine Symptome
	15	Hundehämoglobin	Leichte Symptome
$\frac{1}{100}$ ccm aufgelöste Hundebloodkörper.	15	Pferdehämoglobin	Leichtes Zucken
	16	Hundehämoglobin	Schwere Sympt., blieb am Leben
Hundehämoglobin	16	1 ccm Pferdeblutkörper.	Keine Symptome
	17	Hundehämoglobin	Leichte Symptome

1) Das Hämoglobin wurde hergestellt durch Lösung der gut ausgewaschenen Blutkörperchen in dreifachem Volumen destillierten Wassers, Hinstellen während zwei Stunden bei 37°, Schütteln mit etwas Aether, Abdampfen des Aethers durch Hinstellen bei Zimmertemperatur, Abkühlung auf 0°, Schütteln mit  $\frac{1}{4}$  Vol. auf 0° abgekühlten absoluten Alkohols, Hinstellen während zwei Tagen bei niedriger Temperatur (0—5°), Abzentrifugieren des Kristallbreies, Auswaschen mit abgekühltem 25-proz. Alkohol, Zentrifugieren, Auflösen in Wasser und Umkristallisation.

2) Hygienic Laboratory Bulletin No. 36, Washington 1907.

Ob sich auch für andere Zellen als Erythrocyten eine ähnliche, spezifische Anaphylaxie hervorrufen läßt wie für jene, ist vielleicht zu bezweifeln. Von Kraus, Doerr und Sohma<sup>1)</sup> sowie von Uhlenhuth und Andrejew<sup>2)</sup> angestellte Untersuchungen über Anaphylaxie für Extrakt aus Linsen des Auges erwiesen, daß solche Extrakte keine artspezifische Anaphylaxie ergeben (so wenig, wie man mit Linsenextrakt artspezifische Präzipitine hervorrufen kann), sondern daß mit Linsenextrakt sensibilisierte Tiere nicht auf Serum reagieren, wie auch mit Serum sensibilisierte Tiere nicht auf Linsenextrakt reagieren. Ranzi<sup>3)</sup> untersuchte Extrakte aus verschiedenen Organen und Tumoren und fand, daß man mit solchen Extrakten Meer-schweinchen sensibilisieren kann, die Anaphylaxie aber nicht organspezifisch ist, indem sowohl Extrakte aus anderen Organen als auch Serum die Anaphylaxiesymptome auslösen können. Das gleiche gilt von Extrakten aus Tumoren. Aus Ranzis Arbeit ist aber nicht ersichtlich, daß er sich versichert hat, daß die zur Sensibilisierung verwandten Extrakte aus von Blut befreiten Organen hergestellt waren. War das nicht der Fall, so ist es, angesichts der geringen Menge von Serum, die zur Sensibilisierung genügt, ganz verständlich, daß die Extrakte auch Anaphylaxie für Serum ergeben haben. Schließlich glaubten auch H. Pfeiffer und J. Finsterer<sup>4)</sup> noch ganz kürzlich, einen „anaphylaktischen Reaktionskörper“ in dem Blut von Krebspatienten nachweisen zu können, welcher Meerschweinchen eine passive Anaphylaxie beibringen können sollte, so daß die Tiere mit Erniedrigung der Temperatur auf eine Injektion von Extrakt aus Carcinomen reagierten, und zwar nur auf eine solche. Nach den Untersuchungen Pfeiffers sollte jedoch nicht die Unterscheidung der einzelnen Carcinomformen auf diese Weise möglich sein, sondern nur die Lösung der Frage, Carcinom oder nicht.

Wo in meinen Untersuchungen von Erzeugung anaphylaktischer Symptome mit Erythrocyten die Rede war, handelte es sich stets um in Wasser gelöste Zellen. Wenn man näm-

1) Wien. klin. Wochenschr., 1908, No. 30.

2) Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheits-Amte, Bd. 30, 1909, H. 2.

3) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Bd. 2, 1909, H. 1.

4) Wien. klin. Wochenschr., 1909, No. 28.

lich ungelöste, in Salzwasser gewaschene Erythrocyten einem mit Blutkörperchen sensibilisierten Meerschweinchen injiziert, so ergibt sich ein wesentlich anderes Resultat. Die ungelösten Blutkörperchen lösen entweder gar keine Symptome aus oder aber die letzteren gehen nicht über das erste Stadium der Krankheit, die Irritationserscheinungen, Unruhe und Jucken, hinaus. Das derart behandelte Tier ist dagegen antianaphylaktisch gegen Blutkörperchen geworden, und diese Antianaphylaxie ist schon 1 Stunde nach der Injektion der ungelösten Blutkörperchen deutlich ausgeprägt, noch mehr aber nach 4—5 Stunden; die nachstehende Tabelle (VIII) zeigt dies.

Tabelle VIII.

Sensibilisiert mit	Zahl der Tage nach der Sensibilisierung	Injektion von	Ergebnis
$\frac{1}{100}$ ccm Pferdeblutkörperchen	15	1 ccm ungelöste Pferdeblutkörperchen	Keine Symptome
	15 + 6 Std.	1 „ gelöste Pferdeblutkörperchen	Etwas stumpf
dgl.	15	1 „ ungelöste Pferdeblutkörperchen	Etwas Jucken
	15 + 4 Std.	1 „ gelöste Pferdeblutkörperchen	Geringe Stumpfheit
dgl.	15	1 „ ungelöste Pferdeblutkörperchen	Starkes Jucken
	15 + 2 Std.	1 „ gelöste Pferdeblutkörperchen	Keine Symptome
dgl.	15	1 „ ungelöste Pferdeblutkörperchen	Leichtes Jucken
	15 + 2 Std.	1 „ gelöste Pferdeblutkörperchen	Stumpf
dgl.	15	1 „ ungelöste Pferdeblutkörperchen	Keine Symptome
	15 + 1½ Std.	1 „ gelöste Pferdeblutkörperchen	Stumpf
dgl.	15	1 „ ungelöste Pferdeblutkörperchen	Starkes Jucken
	15 + 1½ Std.	1 „ gelöste Pferdeblutkörperchen	Stumpf
dgl.	15	1 „ ungelöste Pferdeblutkörperchen	Unerhebl. Jucken
	15 + 1 Std.	1 „ gelöste Pferdeblutkörperchen	Stumpf
dgl.	15	1 „ ungelöste Pferdeblutkörperchen	Starkes Jucken
	15 + 1 Std.	1 „ gelöste Pferdeblutkörperchen	Stumpf

Keines der Tiere starb oder wies erhebliche Symptome auf. Der Verlauf war bei allen 8 Tieren ganz typisch. Auf die Injektion der ungelösten Blutkörperchen folgte entweder mehr oder minder heftiges Jucken und Unruhe, oder aber sie verblieb ganz ohne Wirkung. Eine Temperaturerniedrigung wurde nicht wahrgenommen. Die Injektion der gelösten Blutkörperchen übte eine eigentümliche abstumpfende Wirkung aus. Besonders auffällig war sie bei einem der beiden Tiere, denen mit nur einstündigem Zwischenraum ungelöste und gelöste Blutkörperchen injiziert wurden. Während einer Stunde nach der ersten Injektion kratzte sich das Tier unablässig; die zweite Injektion beseitigte sofort das Jucken. Das Tier saß ruhig und stumpf in einem Winkel und war nach  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{3}{4}$  Stunden vollkommen normal.

Dieses im ersten Augenblick etwas eigentümliche Verhältnis zwischen der Wirkung ungelöster und der gelöster Blutkörperchen ist wahrscheinlich als Analogie zu der von Besredka<sup>1)</sup> gefundenen präventiven Wirkung kleiner Serum-mengen auf mit Serum sensibilisierte Tiere zu betrachten. Besredka fand, daß intraperitoneale Injektion so geringer Serum-mengen wie  $\frac{1}{50}$  oder  $\frac{1}{100}$  ccm, die an sich kein Symptom an sensibilisierten Tieren auslösten, die Meerschweinchen für eine große Dosis immun machten, auch wenn diese schon 5 Stunden später gegeben wurde. Da es Tatsache ist, daß intakte Blutkörperchen sehr langsam in der Peritonealhöhle des Meerschweinchens sich auflösen, wovon ich selbst mich oft bei meinen Untersuchungen überzeugen konnte, ist anzunehmen, daß bei Injektion der ungelösten Blutkörperchen eine größere Menge von Gift — man möge sich sein Entstehen erklären, wie es auch sei — nicht plötzlich frei wird, sondern daß die Auslösung so allmählich und langsam erfolgt, daß die Anaphylaxiesymptome nicht über das erste Stadium der Krankheit hinausgehen, ehe das Tier eine Antianaphylaxie erlangt hat, die es nunmehr gegen weiteren Zufluß schützt. Dazu stimmt gut, daß verhältnismäßig kleine Mengen von gelöstem Hämoglobin (1—2 mg) dieselbe Wirkung haben, wie 1 ccm ungelöste Blutkörperchen. Dieses Quantum, das an sich keine er-

1) Compt. rend. Soc. Biol. 1909, No. 3.



heblichen Anaphylaxiesymptome auslöst, macht ebenfalls sensibilisierte Meerschweinchen relativ immun gegen Injektion von gelösten Blutkörperchen (s. Tabelle IX).

Tabelle IX.

Sensibilisiert mit	Zahl der Tage nach der Sensibilisierung	Injektion von	Ergebnis
$\frac{1}{100}$ ccm Pferdeblutkörperchen	16	0,3 mg Pferdehäoglobin	Keine Symptome
	16 + 3 Std.	1 ccm gelöste Pferdeblutkörperchen	† nach 28 Min.
dgl.	16	0,4 mg Pferdehäoglobin	Keine Symptome
	16 + 3 Std.	1 ccm gelöste Pferdeblutkörperchen	† nach 36 Min.
dgl.	16	0,8 mg Pferdehäoglobin	Leichtes Jucken
	16 + 3 Std.	1 ccm gelöste Pferdeblutkörperchen	Schwere Symptome, bleibt am Leben
dgl.	16	1 mg Pferdehäoglobin	Jucken, Unruhe
	16 + 3 Std.	1 ccm gelöste Pferdeblutkörperchen	Keine Symptome
dgl.	16	1,3 mg Pferdehäoglobin	Jucken, Unruhe
	16 + 3 Std.	1 ccm gelöste Pferdeblutkörperchen	Keine Symptome
dgl.	16	1,6 mg Pferdehäoglobin	Starkes Jucken
	16 + 3 Std.	1 ccm gelöste Pferdeblutkörperchen	Stumpf, sonst keine Symptome
dgl.	16	2 mg Pferdehäoglobin	Starkes Jucken
	16 + 3 Std.	1 ccm gelöste Pferdeblutkörperchen	Stumpf, sonst keine Symptome
dgl.	16	3 mg Pferdehäoglobin	Schwere Symptome, bleibt am Leben
	16 + 3 Std.	1 ccm gelöste Pferdeblutkörperchen	Keine Symptome
dgl.	16	5 mg Pferdehäoglobin	† nach 52 Min.

Von den in den Tabellen VIII und IX verzeichneten Tieren zeigte keines eine Erniedrigung der Temperatur, weder nach der ersten noch nach der zweiten Reinjektion; wie oben erwähnt, hat H. Pfeiffer eine sogar recht bedeutende Tem-

peraturerniedrigung als das einzige und sehr konstante Anzeichen einer Anaphylaxiereaktion beobachtet. Auch ich habe die Rectaltemperatur meiner Tiere vor und nach der Injektion genommen und sogar recht bedeutende Erniedrigung der Temperatur (um bis zu 6,5°) wahrgenommen, jedoch stets nur in Verbindung mit anderen ausgeprägten Anaphylaxiesymptomen. Die wenigen meiner Tiere, die auf eine homologe Reinjektion nur mit leichten Anaphylaxiesymptomen antworteten, zeigten entweder keine Temperaturerniedrigung oder doch nur eine solche um wenige Zehntel von Graden. Eine direkte Nachprüfung der Pfeifferschen Untersuchungen habe ich jedoch noch nicht vorgenommen.

#### Zusammenfassung.

Sensibilisierung von Meerschweinchen mit Blut erzeugt zwei gänzlich verschiedene Anaphylaxien, eine für Serum und eine für gelöste Erythrocyten. Nur mit Serum sensibilisierte Meerschweinchen sind nicht anaphylaktisch für die homologen Erythrocyten, und die letzteren allein ergeben keine Anaphylaxie für das homologe Serum. Injektion von Serum bzw. Erythrocyten in ein mit Blut sensibilisiertes Tier ergibt keine Antianaphylaxie für die entsprechenden Erythrocyten bzw. Serum. Die Anaphylaxie für Erythrocyten ist bis zu einem gewissen Grade artspezifisch und kann den medikoforensischen Nachweis der Art einer Blutspur ergänzen.

Die anaphylaktisierende Wirkung der Erythrocyten ist, wenigstens zur Hauptsache, dem Hämoglobin zuzuschreiben. Ungelöste Erythrocyten erzeugen, ebenso wie reines Hämoglobin, eine Antianaphylaxie für aufgelöste Erythrocyten.

---

Herrn Direktor Dr. Th. Madsen spreche ich für Rat und Beistand während der Arbeit meinen besten Dank aus.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Hauptstädtischen Bakteriologischen Institute in Budapest (Leiter: Doz. Dr. Bernhard Vas).]

### **Untersuchungen über die Fermentnatur des Komplementes <sup>1)</sup>.**

Von Dr. Julius Kiss in Budapest.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. September 1909.)

Fermente spielen im lebenden Organismus eine wichtige Rolle und wir pflegen bei den am meisten verwickelten biologischen Erscheinungen oft schon im vorhinein Fermentwirkungen zu vermuten. So tauchte auch seit dem Bekanntwerden der komplexen Natur der Hämolsine immer wieder der Gedanke auf, daß Ambozeptor und Komplement fermentartige Stoffe darstellen. Diese Vermutung lag aus vielen Gründen nahe. Diese Stoffe werden im lebenden Organismus gebildet, ihre Wirkung ist spezifisch und sie vermögen in verhältnismäßig geringen Mengen große Wirkungen zu entfalten. Allerdings genügt das noch nicht zur Feststellung der Fermentnatur, und was den Ambozeptor betrifft, so läßt sich auch weiter nichts zugunsten seiner Fermentnatur vorbringen. Das Komplement weist hingegen mit den organischen Fermenten auch in anderen Beziehungen Analogien auf. Es erinnert in seinem Verhalten vielfach an lebende Zellen. Das Komplement unterliegt außerhalb des lebenden Organismus einer Veränderung, welche am besten mit dem langsamen Absterben der vom Organismus losgelösten Zelle oder Gewebe verglichen werden kann; durch Protoplasmagifte wird es zerstört, vergiftet; es ist ferner thermolabil. Solche Erscheinungen sind gewöhnlich bei organischen Fermenten anzutreffen. Bei der Untersuchung der Hämolsine kamen jedoch bisher diese Analogien kaum ernstlich in Betracht und es schien, als ob die Fermentnatur des Komplementes bei der Erklärung der Beobachtungen ganz außer acht gelassen werden könnte.

---

1) Zum Teil vorgetragen auf dem XVI. internationalen Medizinischen Kongreß in Budapest.

Die Wirkung eines Fermentes ist nämlich eine Kontaktwirkung; es beschleunigt durch seine Gegenwart einen Umwandlungsprozeß, ohne seine chemische und physikalische Beschaffenheit zu verändern, es wirkt katalytisch. Die Wirkung eines Fermentes ist demnach unbegrenzt, vorausgesetzt daß dasselbe durch die entstandenen Zersetzungsprodukte oder durch fremde Einflüsse in seiner Tätigkeit nicht gehemmt wird. Wenn dagegen irgendein Stoff eine chemische Verbindung eingeht oder seine chemische Beschaffenheit verändert, indem er seine Wirkung entfaltet, so wirkt er in dem gegebenen Falle nicht als Ferment.

Alle Ansichten lauten dahin, daß das Komplement bei der Hämolyse gebunden und quantitativ aufgebraucht wird. Wenn diese Anschauung richtig ist, so wirkt das Komplement bei der Hämolyse nicht als Ferment.

Betreffs der Wirkung der Hämolsine werden von einer großen Mehrzahl der Forscher die Ansichten Ehrlichs geteilt und wenn auch dieselben von manchen Seiten angegriffen wurden, bilden sie doch den Mittelpunkt, um welchen sich in unseren Tagen die Forschung bewegt.

Nach Ehrlich wird, wie bekannt, der Ambozeptor durch die Rezeptoren der Zelle gebunden und nachdem diese Bindung erfolgt ist, tritt das Komplement an den Ambozeptor heran, um das Hämolsin zu bilden. Das Hämolsinmolekül, welches auf diese Weise entsteht, muß demnach immer die gleiche chemische Beschaffenheit besitzen, denn Ambozeptor und Komplement sind chemisch miteinander verbunden. Im Gegensatz zu Ehrlichs Anschauungen stehen diejenigen Bordets, laut welchen das Komplement durch die Substanz der Zelle selbst gebunden wird, nachdem dieselbe durch den Ambozeptor sensibilisiert wurde. Es ist bekannt, welche wichtige Folgen diese verschiedene Anschauungsweise bei der Deutung sämtlicher Immunitätsvorgänge nach sich gezogen hat; der Gegensatz der Anschauungen wiederholte sich fast bei jeder neu entdeckten Erscheinung. Als feststehendes Prinzip wurde jedoch von allen Seiten angenommen, daß das Komplement gebunden wird.

Arrhenius hat es in der letzten Zeit unternommen, die Immunitätsreaktionen nach den Grundsätzen der physikalischen Chemie zu behandeln und bei der Behandlung der Frage der Hämolsine betrachtete er die chemische Bindung von Ambozeptor und Komplement als feststehende Tatsache. Obwohl Arrhenius durch die mathematische Behandlung des Problems zu Schlüssen kommt, welche mit den Ehrlichschen Hypothesen nicht vereinbar sind, so ist doch sein Unternehmen als eine wissenschaftliche Weiterentwicklung der Ehrlichschen Ideen zu betrachten.

Bei der Begründung einer neuen Anschauungsweise steht einem kein anderer Weg offen, als jener, welchen schon Arrhenius eingeschlagen hat, d. i. die Untersuchung der quantitativen Verhältnisse zwischen Ambozeptor und Komplement. Da man bisher auf Grund der mathematischen Behandlung keinen Anlaß fand, um die Bindung des Komplementes zu bezweifeln, so ist scheinbar wenig Aussicht vorhanden zur Feststellung der Fermentnatur des Komplementes. Bei der näheren Betrachtung der bisherigen Beobachtungen werden wir aber manche Tatsachen finden, welche wir für die letztere Auffassung verwerten können. Um aber die Uebersichtlichkeit zu erleichtern, beginne ich mit meinen eigenen Beobachtungen.

Zu den unten mitgeteilten Versuchen habe ich folgende Komponenten verwendet: 1) gewaschene Rinderblutkörperchen, 2) Ambozeptor eines vom Kaninchen stammenden Immunsersums, welcher Rinderblutzellen stark löste, 3) Meerschweinchenserum als Komplement. Als Einheit der Blutkörperchen wählte ich nach dem Vorgange des Ehrlich'schen Institutes 1 ccm einer 5-proz. Blutaufschwemmung, also 0,05 ccm einer 100-proz. Aufschwemmung, als Einheit des Komplementes diente 0,05 ccm Meerschweinchenserum; der Titer des Immunsersums betrug 0,00125 ccm. Die Gemische wurden mit einer 0,85-proz. Kochsalzlösung immer auf 5 ccm Volum ergänzt. Ich verfuhr nach der in den meisten Laboratorien üblichen Methode und ließ die Gemische 2 Stunden im Brutschrank bei 37° C Temperatur stehen.

Ich untersuchte zunächst, wie sich die zur Lösung einer Blutkörpercheneinheit notwendige Komplementmenge verringert, wenn die Gabe des Ambozeptors vergrößert wird. Tabelle I bezieht sich auf einen solchen Versuch und zeigt den verschiedenen Ambozeptormengen entsprechende Komplementmengen an.

Tabelle I.

Ambozeptor in Einheiten	Komplement in Einheiten
1	1,00
2	0,60
4	0,40
10	0,20
20	0,20
50	0,15
100	0,20

Bei einem Ueberschuß des Ambozeptors genügen also 0,20—0,15 Komplementeinheiten (d. i. 0,01—0,007 ccm Meerschweinchenserum) zur kompletten Hämolyse.

Untersuchen wir jetzt, auf welche Weise die Erhöhung der Komplementgabe über die gewählte Einheit hinaus auf die Größe der Ambozeptormenge einwirkt. Weil aber das Serum von ausgewachsenen Meerschweinchen normalerweise auch Ambozeptoren für Rinderblutkörperchen besitzt, mußte ich das Serum von neugeborenen Tieren zu den Versuchen verwenden und wegen der kleinen Menge des zur Verfügung stehenden Materials die Versuche mit geringeren Quantitäten ausführen. Die erhaltenen Werte wurden auf 5 ccm Volum umgerechnet.

Mit der Erhöhung der Komplementgabe wird, wie Tabelle II beweist, die zur vollständigen Lösung notwendige Gabe des Ambozeptors verringert.

Tabelle II.

Komplement in Einheiten	Ambozeptor in Einheiten
1	1,00
2	0,75
4	0,50
8	0,40
20	0,25
40	0,25

Die geringste Gabe des Ambozeptors, welche mit einem großen Ueberschuß von Komplement komplette Hämolyse erzeugt, beträgt 0,25 Einheiten.

Es können also gewisse Minima festgestellt werden ebenso für das Komplement, wie für den Ambozeptor; bei Anwendung einer geringeren Gabe als es diesem Minimum entspricht, entsteht keine Hämolyse. Sonst ergibt es sich als Regel für den Ambozeptor und für das Komplement, daß beim Ueberschuß des einen Komponenten eine entsprechend geringere Gabe des anderen zur vollständigen Hämolyse ausreicht.

Diese Tatsache ist mit der chemischen Bindung der beiden Komponenten schwer vereinbar, denn eine chemische Bindung erfolgt nach chemisch äquivalenten Mengen. Man müßte annehmen, daß, um eine bestimmte Menge Hämolsin zu bilden, einer oder beide der Komponenten im Gemische in großem Ueberschuß anwesend sein müssen.

Tatsächlich haben Morgenroth und Sachs die Verringerung des Komplementbedarfes bei erhöhter Ambozeptor-

gabe durch eine ähnliche Annahme zu erklären versucht, indem sie sich auf das Massenwirkungsgesetz und auf die geringe chemische Affinität der Komponenten berufen haben. Man könnte gegen diese Erklärung nichts einwenden, wenn es sich bloß in manchen Fällen um die Verringerung des Komplementbedarfes handeln würde. Es ist aber schwer zu erklären, warum sich unter Umständen auch der Bedarf an Ambozeptor verringert. Ein Ambozeptor kann doch nach Ehrlichs Schema gewöhnlich bloß ein Komplement binden und wenn also weniger als z. B. eine Einheit des Ambozeptors an die Zelle gebunden ist, so könnte sich daraus nie eine Einheit des Hämolytins bilden. Man müßte also das Minimum des Ambozeptors, welches mit einem großen Ueberschuß von Komplement Hämolyse erzeugt, als Einheit des Ambozeptors betrachten. In diesem Falle besteht aber zwischen den respektiven Quantitäten ein so großes Mißverhältnis, daß man sich zu einer solchen Annahme kaum entschließen kann. Man wird vielmehr zu der Annahme geführt, daß die Einheiten, mit welchen wir es in den Hämolytinsuntersuchungen zu tun haben, überhaupt keine fixen Größen sind. Wenn wir verschiedene Mengen von Meerschweinchenserum als Komplementeinheit wählen, so wird die Einheit des Ambozeptors verschieden groß; dadurch wird aber auch die „Rezeptoreinheit“, d. h. diejenige Menge der Rezeptoren, welche eine Einheit des Ambozeptors bindet, verändert. Die Rezeptoreinheit besteht also nicht als fixe Größe, sondern bloß in Beziehung zu einer gewissen Menge Meerschweinchenserum.

Morgenroth und Sachs kamen bei der Behandlung der quantitativen Verhältnisse von Ambozeptor und Komplement zu dem Schluß, daß es auf diesem Gebiete keine allgemeinen Regeln gibt, daß vielmehr ein jeder Fall durch eigene Gesetze geregelt wird. In einer Reihe der von ihnen untersuchten Fälle stellte es sich heraus, daß die Menge des zur Hämolyse notwendigen Komplementes sich nicht geändert hat, wenn die Menge des Ambozeptors vermehrt wurde. In anderen Fällen hat sich dagegen der Komplementbedarf stark vermindert, wenn die Blutkörperchen mit mehr Ambozeptor beladen waren. Wir halten aber die erwähnte Deutung der beobachteten Tatsachen nicht für einwandfrei.

Wir können die von Morgenroth und Sachs beschriebenen verschiedenen Fälle der Komplettierung, von welchen oben die Rede war, je nach Wunsch hervorbringen, wenn wir verschiedene Mengen Meerschweinchenserum als Komplementeinheit annehmen.

Es sei z. B. 0,01 ccm die Einheit des Komplementes; die entsprechende Einheit des Ambozeptors beträgt beim Gebrauch des oben beschriebenen Immunserums 0,0125 ccm. Eine geringere Menge als 0,01 ccm Komplement bewirkt aber selbst mit bedeutend größeren Immunserummengen keine Hämolyse: wir haben also den Fall vor uns, in welchem der Komplementbedarf durch Steigerung der Ambozeptormenge nicht geringer wird.

Nehmen wir dagegen eine größere Menge Komplement als Einheit an, so beobachten wir die von Morgenroth und Sachs beschriebene Erscheinung, d. h. die Verringerung des Komplementbedarfes. Der Bedarf kann sich um so mehr verringern, je größer die von uns willkürlich gewählte Komplementeinheit war.

Wenn wir den extremen Fall wählen, d. h. wenn wir 2 ccm Meerschweinchenserum für den ersten Versuch nehmen, so beobachten wir den Fall einer Verringerung des Komplementbedarfes um das 200-fache. Solche Extremfälle sind aber bloß bei Anwendung stark wirkender Komponenten zu beobachten, wie diese in unserem Falle geschah. Bei Anwendung eines schwachen Ambozeptors oder eines schwachen Komplementes können die ihrer Natur nach bisher nicht völlig aufgeklärten störenden Momente die allgemeine Regel verdecken. Wir haben allenfalls genügenden Grund, die von Morgenroth und Sachs beschriebenen Typen als zufällig entstandene Einzelfälle zu betrachten, welche in ihrer Gesamtheit dieselbe Regel beweisen, welche aus meinen eben mitgeteilten Versuchen folgt.

Es ließe sich auf Grund des Auseinandergesetzten die Folgerung machen, daß das komplexe Hämolysin als ein Gemisch von Ambozeptor und Komplement aufzufassen ist, und zwar ein Gemisch von sehr variablen Verhältnissen. Diese Annahme könnte dann mit Bordets Hypothese in Einklang gebracht werden. Wir werden aber zu anderen Annahmen



geführt, wenn wir den Mechanismus der Komplementwirkung näher betrachten.

Die Ambozeptoren werden von den Blutkörperchen quantitativ gebunden, wenn die Menge der Ambozeptoren eine bestimmte Grenze nicht überschreitet. Die Bindung der Ambozeptoren ist von dem Volum des Gemisches unabhängig. Das Komplement wird im Sinne der geläufigen Annahmen, wie ich schon erwähnte, durch die ambozeptorbeladenen — sensibilisierten — Blutkörperchen gebunden. Man kann sich aber davon überzeugen, daß die Wirkung des Komplementes von dem Volum des Gemisches abhängig ist. Dieselbe Menge Komplementes hat in einem geringeren Volum eine größere Wirkung.

0,05 ccm Komplement genügen, um die Einheit der Blutkörperchen, welche mit der Einheit der Ambozeptoren beladen waren, in 5 ccm Volum aufzulösen. Mit 0,02 ccm Komplement ist keine Spur von Hämolyse zu beobachten, wenn das Volum des Gemisches dasselbe bleibt. Bei 2,5 ccm Volum bewirken aber 0,02 ccm Komplement schon eine schwache Hämolyse. Wenn das Volum des Gemisches nicht mehr als 1,25 ccm beträgt, so wird die zugesetzte Blutmenge in kurzer Zeit vollständig hämolysiert. Es ist also klar, daß nicht nur die relative Menge des Komplementes — die Konzentration des Komplementes — bei der Hämolyse von ausschlaggebender Wichtigkeit ist, sondern daß in einem geringeren Volum auch die absolute Menge, welche zur kompletten Hämolyse ausreicht, geringer ist.

Die Eigenartigkeit dieser Verhältnisse kommt in den folgenden Versuchen noch besser zum Vorschein.

Wir nehmen 0,04 ccm Komplement in 5 ccm Volum, also eine Menge, welche nicht ausreicht, um die Einheit der einfach beladenen Blutkörperchen vollständig zu hämolysieren. Wir bereiten nun die Gemische anstatt mit einer Einheit von einfach beladenen Blutkörperchen mit zwei Einheiten. Wir müßten in diesem Falle erwarten, daß die Hämolyse in diesen Gemischen schwächer wird; die an sich unzureichende Menge Komplementes muß sich doch auf die doppelte Menge Ambozeptoren verteilen. Bei Anwesenheit eines vielfachen Multiplums der Blutkörpercheneinheit käme endlich bloß ein kleiner

Bruchteil von Komplement auf jedes Blutkörperchen, so daß eine Hämolyse überhaupt nicht mehr erfolgen dürfte. In Wirklichkeit beobachten wir aber das Gegenteil. In den Gemischen nimmt die Menge des aufgelösten Blutes bis zu einer bestimmten Grenze fortwährend zu, wenn bei gleichbleibendem Volum die Menge der zugesetzten ambozeptorbeladenen Blutkörperchen zunimmt. Dies zeigt die beifolgende Tabelle an. Die Menge der hämolysierten Blutkörperchen wurde in diesen Fällen so bestimmt, daß die Gemische nach 2-stündigem Aufenthalt im Brutschranke bei 37° C Temperatur zentrifugiert und die Flüssigkeiten abgegossen wurden. Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes erfolgte durch Kolorimetrie. Mit Rücksichtnahme auf das Volum der abgegossenen Flüssigkeit konnte die Menge der aufgelösten Blutkörperchen in den von uns gewählten Einheiten (eine Einheit = 0,05 ccm Blut) ausgedrückt werden.

Tabelle III.

Menge der Blutkörperchen in Einheiten:	
Zugesetzt wurden	Davon hämolysiert
0,25	0,20
0,50	0,35
1,0	0,80
3,0	1,60
3,0	2,50
6,0	3,5
12,5	5,0
25,0	9,0
50,0	9,9
100,0	9,3

Wir beobachten also, daß eine Komplementmenge, welche an sich nicht genügt, um eine Einheit der Blutkörperchen in 5 ccm Volum vollständig zu hämolysieren, das vielfache Multiplum dieser Einheit hämolysiert, wenn im Gemische ein großer Ueberschuß der Blutkörperchen bei gleichbleibendem Volum zugegen ist.

Es ist merkwürdig, daß die Hämolyse selbst in dem Falle unvollkommen bleibt, wenn dem Gemische weniger als eine Einheit der Blutkörperchen zugesetzt wird. Ob also viel oder wenig zugesetzt wird, ein Bruchteil bleibt ungelöst. Die Menge des hämolysierten Blutes ist der zugesetzten Menge proportional, solange letztere 4–6 Einheiten nicht überschreitet;

bei einem größeren Blutgehalt des Gemisches nimmt die hämolysierte Menge verhältnismäßig langsam zu.

Wir haben in diesen Versuchen 0,04 ccm Komplement zugesetzt, um die Möglichkeit auszuschließen, daß das Komplement in Ueberschuß vorhanden sei. Wir erhalten aber analoge Resultate mit 0,05 ccm Komplement. In diesem Falle tritt aber in den Gemischen, welche relativ wenig Blut enthalten, komplette Hämolyse ein. Die Resultate sind in Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV.

Menge der Blutkörperchen in Einheiten :	
Zugesetzt wurden	Davon hämolysiert
0,25	0,25
0,50	0,50
1,0	1,0
2,0	2,0
4,0	4,0
6,0	5,5
12,5	10,0
25,0	12,0
50,0	12,0
100,0	15,0

Die Einheit des Komplementes genügt also zur vollständigen Hämolyse von ca. 6 Einheiten. Bei einem wachsenden Ueberschuß werden bis 15 Blutkörpercheneinheiten hämolysiert.

Die Geschwindigkeit und die Stärke der Hämolyse nimmt so bei gleichbleibender Komplementmenge zu, wenn

- 1) das Volum des Gemisches verringert wird;
- 2) wenn bei gleichbleibendem Volum die Menge der sensibilisierten Blutkörperchen vermehrt wird;
- 3) der Grad der Hämolyse ist unter weiten Grenzen von der absoluten Menge des Komplementes unabhängig. Diese Tatsachen sind durch die Annahme am besten zu erklären, daß das Komplement als Katalysator wirkt.

Wie ist nun eine solche Annahme mit der alltäglichen Erfahrung in Einklang zu bringen? Es gilt doch als ein Gesetz der Immunitätslehre, daß bei der Bindung eines Antigens mit seinem entsprechenden Antikörper auch das Komplement gebunden wird, d. h. daß es aus dem Gemische verschwindet. Es ist sogar bekannt, daß von den Blutkörperchen

unter Umständen bedeutend mehr Hämolysin — also auch Komplement — gebunden werden kann, als zur kompletten Hämolysen ausreicht. Bordet<sup>1)</sup> machte die Beobachtung, daß, wenn man das Blut dem hämolysinhaltigen Serum nicht auf einmal, sondern in bestimmten Zeitintervallen fraktioniert zusetzt, der Gesamtbetrag der Hämolysen bedeutend geringer wird. In solchen Fällen müssen also die ersten Zusätze mehr Hämolysin gebunden haben, so daß für die später erfolgten Zusätze kein Hämolysin mehr übrig bleibt.

Es soll nicht in Abrede gestellt werden, daß das Komplement Einflüssen unterliegt, durch die es aus den Gemischen verschwindet oder, um den gewöhnlichen Ausdruck zu gebrauchen, gebunden wird. Würde es nicht gebunden werden, so würde es unbegrenzt weiter wirken, was doch auch in den oben mitgeteilten Versuchen nicht der Fall war. Das Komplement wird zweifellos gebunden, diese Bindung erfolgt aber nach anderen Regeln, als die Hämolysen selbst.

Die Erscheinung der raschen Komplementbindung tritt in solchen Fällen zum Vorschein, in welchen der Komplementgehalt im Verhältnis zur Menge der Blutkörperchen und des Ambozeptors relativ gering ist. Außerdem geht das Komplement oft dadurch zugrunde, daß die Sera von verschiedenen Tierspecies gegenseitig aufeinander wirken.

Wenn wir z. B. die gleichen Versuche wie die, welche in Tabelle III mitgeteilt sind, mit bloß 0,02 ccm Komplement ausführen, so werden wir die Grenzen der Komplementwirkung ziemlich beschränkt finden. In diesem Falle muß, wie aus dem Auseinandergesetzten erhellt, die Ambozeptormenge auf das Zehnfache erhöht werden, um komplette Hämolysen zu bewirken. Wird aber eine große Menge dieser stark sensibilisierten Blutkörperchen zugesetzt, so erreichen wir dadurch keine starke Hämolysen; die Hämolysen erreicht in dem Gemische, welches 3 Blutkörpercheneinheiten enthält, sein Maximum, diese Menge wird noch durch 0,02 ccm Komplement vollständig gelöst.

Ein anderer schon bisher bekannter Fall der Herabsetzung der Wirksamkeit des Komplementes ist derjenige, welcher mit dem Namen der Komplementablenkung bezeichnet

---

1) Annales de l'Institut Pasteur, 1900.

wird. Bei Gegenwart eines großen Ueberschusses von Ambozeptor werden selbst geringe Mengen Blutkörperchen durch das Komplement wenig angegriffen. Als Ursache dieser Erscheinung hat Gay<sup>1)</sup> die präzipitierende Wirkung des Immunserrums erkannt. Selbst an gut gewaschenen Blutkörperchen haften noch Spuren von Serum an, welche mit dem Immunserrum ein Präzipitat erzeugen, und dieses reißt das Komplement an sich. Nach meinen eigenen Erfahrungen tritt die Erscheinung der Komplementablenkung in höherem Grade bloß bei schwachen Immunserris auf; in manchen Fällen konnte ich dieselbe, wo ich es mit schwachen Immunserris zu tun hatte, bei 40 Ambozeptoreinheiten beobachten, bei sehr starken Seris entstand das Phänomen erst etwa bei 500 Ambozeptoreinheiten. Es ist ferner zu bemerken, daß die Komplementablenkung gewöhnlich bei Anwendung von geringen Mengen oder bei schwach wirkenden Komplementen zum Vorschein kommt.

Die gegenseitige Beeinflussung der Sera von verschiedenen Tierspecies ist ebenfalls eine Erscheinung, welche heute noch nicht genügend erforscht ist, auf welche wir aber Rücksicht nehmen müssen, besonders wenn die Gemische große Serumengen enthalten. Meiner Ansicht nach waren auch in dem erwähnten Versuch Bordets solche Serumbeeinflussungen mit im Spiele. Bordet hat nämlich unverdünntes Immunserrum einfach mit defibriniertem Blute versetzt.

Im folgenden werden wir zeigen, daß eine rasche Komplementbindung nicht in allen Fällen zustande kommt, in welchen man es im Sinne der bisherigen Anschauungen erwarten würde.

Bereiten wir z. B. ein Gemisch mit den Einheiten von Blutkörperchen und Ambozeptor, welche zu 0,05 ccm Meer-schweinchenserum als Komplementeinheit gehören und lassen wir das Gemisch im Brutschrank, bis komplette Hämolyse entsteht. Dem hämolysierten Gemische setzen wir 0,25 ccm einer 100-proz. Blutkörperchenaufschwemmung zu, in welcher die Einheit der Blutkörperchen mit der Einheit der Ambozeptoren beladen sind. Durch das geringe Volum der zugesetzten Blut-

---

1) Annales de l'Institut Pasteur, 1905, p. 593.

körperchenmenge wird die Konzentration des Komplementes nur unbedeutend verringert. Es entsteht auf diese Weise eine starke Hämolyse, es löst sich mehr als die Hälfte der zugesetzten Blutmenge — etwa 3 Einheiten — auf. Wir werden das gleiche Resultat erzielen, wenn wir das hämolysierte Gemisch 24 Stunden im Eisschrank bei 8—10° C stehen lassen und erst nach dieser Frist die größere zweite Gabe der Blutkörperchen zusetzen. An einem kühlen Orte bleibt also das Komplement auch im hämolysierten Gemische noch lange wirksam. Auch im Brutschrank bleibt selbst nach längerem Stehen ein Teil des Komplementes erhalten: Im Brutschrank geht aber das Komplement immer rascher zugrunde, auch wenn es in reinem Zustande daselbst aufbewahrt wird.

Man kann diese Versuche noch vielfach variieren, ohne daß man einen bedeutenden Unterschied infolge des fraktionierten Zusatzes in der Stärke der Hämolyse konstatieren könnte, wenn der erste Zusatz 6 Blutkörpercheneinheiten nicht überschreitet. Hat man dagegen zu Beginn mehr als 6 Blutkörpercheneinheiten zugesetzt, so werden die späteren Zusätze kaum merklich hämolysiert. Die Bindung des Komplementes, dessen Menge in unserem Falle 0,05 ccm betrug, erfolgt also erst dann mit einer größeren Geschwindigkeit, wenn der Blutgehalt des Gemisches 6 Proz. übersteigt, bei einem kleineren Blutgehalt wird das Komplement langsam gebunden und der Eintritt der Hämolyse bedeutet noch nicht die Bindung des Komplementes.

Die Bindung des Komplementes durch die Blutkörperchen ist eine Tatsache, welche nicht zu bezweifeln ist. Wir sind aber auf Grund der mitgeteilten Versuche zu der Annahme berechtigt, daß die Hämolyse der sensibilisierten Blutkörperchen katalytisch erfolgt. Einer jeden Konzentration des Komplementes entspricht ein bestimmter Grad der Sensibilisierung. Wenn sich aber bei einer bestimmten Konzentration des Komplementes ein sensibilisiertes Blutkörperchen auflösen kann, so wird sich im selben Gemische eine große Zahl der Blutkörperchen auflösen. Wir müssen aber bei dieser Erscheinung noch auf gewisse Momente Rücksicht nehmen. Es muß angenommen werden, daß die einzelnen Blutkörperchen,

welche mit gleichen Ambozeptormengen beladen sind, verschiedene Resistenz gegen die katalytische Wirkung besitzen.

So ist es nämlich zu erklären, daß bei Anwendung sehr geringer Blutmengen keine komplette Hämolyse eintritt, solange die Konzentration des Komplementes eine bestimmte Grenze nicht erreicht hat. Es ist ferner zu bemerken, daß die Zeit, welche zur kompletten Hämolyse erforderlich ist, bei größeren Blutmengen immer größer ist. Eine Störung des katalytischen Prozesses ist also selbst bei geringerem Blutgehalt vorhanden, denn bei katalytischen Prozessen ist, wenn sie ungehindert verlaufen, die zur vollständigen Umwandlung erforderliche Zeit, bloß von der Konzentration des Fermentes, nicht aber von der Menge des umwandelnden Stoffes abhängig.

Die mitgeteilten Versuche berechtigen zur Annahme, daß das Komplement als Ferment wirkt und daß dem katalytischen Prozesse unter Umständen dadurch eine Grenze gezogen wird, daß das Komplement infolge von Bindung oder Zerstörung seine Wirksamkeit zum Teile einbüßt.

Für die Annahme der Fermentnatur des Komplementes erhalten wir eine weitere Stütze durch die Beobachtungen über die Beeinflussung der Komplementwirkung durch die Salzkonzentration.

Nolf<sup>1)</sup> hat den Einfluß der Salze auf die Hämolyse durch Gifte zum ersten Mal studiert und fand, daß die Wirkung gewisser normaler Hämolsine durch eine erhöhte Salzkonzentration aufgehoben wird. Das gleiche hat Markl<sup>2)</sup> bestätigt. Ehrlich und Sachs haben festgestellt, daß in hohen Salzkonzentrationen bloß der Ambozeptor nicht aber das Komplement an die Zelle gebunden wird. Wir werden einen tieferen Einblick in diese Verhältnisse gewinnen, wenn wir auf die Feststellung der Einheiten der einzelnen Komponenten mehr Rücksicht nehmen als es bisher geschah.

Es soll zunächst betont werden, daß die Salzkonzentration die Bindung des Ambozeptors an die Zelle nicht merklich beeinflußt. Die Beeinflussung der Hämolyse durch die Salz-

---

1) Annales de l'Institut Pasteur, 1900.

2) Zeitschrift f. Hygiene, 1902.

konzentration beruht daher ausschließlich auf der Beeinflussung des Komplementes.

Ich machte bei diesen Untersuchungen von denselben Komponenten Gebrauch, welche mir zu den obigen Versuchen dienten. Die Berechnungen erfolgten ebenfalls in den oben gebrauchten Einheiten; es muß bloß hervorgehoben werden, daß die Einheiten auf die 0,85-proz. Kochsalzlösung bezogen wurden.

Es kam oft vor, daß die Gemische viel Serum (Immunserum und Komplementserum) enthielten. Bei der Bestimmung des Kochsalzgehaltes verfuhr ich in der Weise, daß ich nicht bloß auf den physiologischen Kochsalzgehalt der Sera Rücksicht nahm, sondern die Berechnung derart ausführte, als wäre dem Gemische anstatt der Sera eine 1-proz. Kochsalzlösung zugesetzt worden.

Das Komplement ist, wie erwähnt, äußerst empfindlich gegen Aenderungen der Kochsalzkonzentration. Wenn wir die Einheiten von Blutkörperchen, Ambozeptor und Komplement in einer 1-proz. anstatt 0,85-proz. Kochsalzlösung zusetzen, so tritt in diesem Gemische keine komplette Hämolyse ein. Um eine solche zu erreichen, muß die Menge des Ambozeptors oder die des Komplementes, oder aber der beiden Komponenten vergrößert werden.

Nehmen wir nun immer die gleiche Menge — 0,05 ccm — Komplement und betrachten wir, wie mit der Aenderung der Salzkonzentration die zur vollständigen Hämolyse ausreichende Menge des Ambozeptors verändert wird.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle V zusammengefaßt.

Tabelle V.

Salzkonzentration	Ambozeptoreinheiten
0,60	0,60
0,85	1,00
1,00	1,15
1,30	3,50
1,60	32,00

Der Bedarf an Ambozeptor erhöht sich also mit der Steigerung der Konzentration sehr bedeutend; bei 1,60 Proz. Kochsalz müssen 32 Ambozeptoreinheiten zur Sensibilisierung benutzt werden. Bei 2 Proz. Kochsalzgehalt wird eine Grenze



erreicht, wo selbst ein enorm großer Ueberschuß des Ambozeptors keine Hämolyse verursacht. Um Hämolyse entstehen zu sehen, muß bei 2 Proz. Kochsalzgehalt auch die Komplementmenge vergrößert werden.

Aus der folgenden Tabelle ist zu ersehen, wie sich die zur Hämolyse hinreichende Menge des Komplementes mit der Salzkonzentration ändert, wenn die Blutkörperchen mit der Einheit des Ambozeptors beladen sind.

Tabelle VI.

Salzkonzentration	Komplementeinheiten
0,60	0,80
0,85	1,00
1,00	1,50
1,30	6,00
1,60	40,00

Der Bedarf an Komplement erhöht sich also mit der Konzentrationssteigerung ebenfalls ganz bedeutend. Bei 2 Proz. Kochsalzgehalt tritt mit 40 Komplementeinheiten keine Hämolyse mehr ein. Diese Menge entspricht 2 ccm Meerschweinchenserum in 5 ccm Volum.

Die bisherigen Versuche zeigen, daß es für jede Konzentration ein bestimmtes Minimum des Ambozeptors oder des Komplementes gibt, welches überschritten werden muß, damit eine Hämolyse überhaupt eintreten kann. Wir wollen in dem Folgenden für jede Salzkonzentration dasjenige Minimum des Ambozeptors resp. des Komplementes bestimmen, welches mit einem großen Ueberschuß des anderen Komponenten eine komplette Hämolyse von einer Blutkörpercheneinheit verursacht.

Tabelle VII.

A. Die Minima des Komplementes, welche mit einem großen Ambozeptorüberschuß Hämolyse erzeugen (Menge des Ambozeptors 500 Einheiten):

Salzkonzentration	Komplementeinheiten
0,60 Proz.	0,1
0,85 „	0,2
1,00 „	0,5
1,50 „	0,7
2,00 „	2,5
3,00 „	20,0
3,25 „	40,0

B. Die Minima des Ambozeptors, welche mit einem großen Komplementüberschuß Hämolyse erzeugen (Komplementmenge 40 Komplementeinheiten):

Salzkonzentration	Ambozeptoreinheit
0,60 Proz.	0,25
0,85 „	0,25
1,00 „	0,40
1,50 „	1,0
2,00 „	8,0
3,00 „	32,0
3,25 „	500,0

Es ergibt sich aus allen diesen Untersuchungen, daß, wenn einer der Komponenten in großem Ueberschuß zugegen ist, die Minima des anderen Komponenten in gleichem Sinne wie die Salzkonzentration zu- oder abnehmen.

Natürlicherweise ersetzen sich die beiden Komponenten bei jeder Konzentration in der Weise, wie in der 0,85-proz. Kochsalzlösung, d. h. ein größerer Zusatz des einen Komponenten verringert den Bedarf des anderen Komponenten. Die Zu- oder Abnahme der Mengen des einzelnen Komponenten erfolgt bei jeder Konzentration kontinuierlich.

Störungen in der Kontinuität der Gesetzmäßigkeiten sind, soweit ich mich überzeugen konnte, bloß unter den Bedingungen zu beobachten, wenn die Kochsalzkonzentration derart beschaffen ist, daß die Lösung ohne jeden fremden Zusatz hämolysiert, oder wenn die Gemische verschieden stark geschüttelt werden.

Es erübrigt noch, zu untersuchen, ob das quantitative Verhältnis, in welchem sich Ambozeptor und Komplement gegenseitig ersetzen können, in jeder Konzentration derart beschaffen ist, daß man auf Grund der oben mitgeteilten, für die 0,85-proz. Kochsalzlösung gültigen Daten, für jede andere Konzentration die entsprechenden Mengen der Komponenten berechnen könnte. Das Versuchsmaterial, welches mir bis jetzt zur Verfügung steht, ist aber nicht leicht zu überblicken. Es scheint, daß der hohe Serumgehalt der Gemische auf die Regelmäßigkeit der Versuchsergebnisse störend einwirkt.

Viele Beobachtungen scheinen mit meinen Versuchsergebnissen in offenbarem Widerspruch zu stehen. Ich werde bloß einige derselben kurz erwähnen. Hewlett<sup>1)</sup> beobachtet, daß

1) Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 49.

die Hämolyse von Kaninchenblutkörperchen durch Hundeserum durch fünffache Verdünnung des Gemisches mit isotonischer Kochsalzlösung aufgehoben wird und meint, daß selbst isotonische Kochsalzlösung die Hämolyse hemmen kann. Es ist klar, daß in seinem Falle die Verdünnung des Komplementes allein an dem Ausbleiben der Hämolyse schuld war, also nicht die isotonische Kochsalzlösung.

Hektoen und Rüdiger<sup>1)</sup> und Manwaring<sup>2)</sup> erklären die Hemmung der Hämolyse bei einer über die Isotonie erhöhten Konzentration dadurch, daß die Salze mit dem Komplement Doppelverbindungen eingehen, die inaktiv, aber reversibel sind. Diese Auffassung ist nicht haltbar. Die Wirkung des Kochsalzes auf das Komplement folgt in der isotonischen Konzentration den gleichen Gesetzen wie bei höherer Konzentration.

Es ist kein anderer Unterschied vorhanden, als daß die Menge des Komplementes mit zunehmender Konzentration vermehrt werden muß, damit die Hämolyse entstehe. Wenn aber in der isotonischen Konzentration keine „Doppelverbindungen“ zwischen Salz, resp. Ionen und Komplement vorhanden sind, so liegt kein Grund vor, eine solche bei erhöhter Salzkonzentration anzunehmen.

Die quantitativen Verhältnisse bei der Hämolyse hat Mioni<sup>3)</sup> eingehend studiert und die verschiedene Resistenz der Blutkörperchen, welche ich oben ebenfalls erwähnt habe, erkannt.

Mioni fand außerdem den Grad der Hämolyse bei gleichbleibender Menge des einen Komponenten des Hämolytins mit der Menge des anderen Komponenten einfach proportional. Man kommt zu solchen Versuchsergebnissen, wenn man Blutkörperchen den Gemischen in großem Ueberschuß zusetzt. In solchem Falle ist für die rasche Bindung des Komplementes Gelegenheit geboten und die Fermentnatur des Komplementes bleibt verdeckt. Die richtige Natur des Komplementes kann nur bei einer entsprechenden Verdünnung

---

1) The Journal of Infections Diseases, Vol. 1, 1904.

2) Ebenda.

3) Annales del' Institut Pasteur, 1904.

erkannt werden, gerade wie die Gesetze der Lösungen in verdünnten Lösungen erkannt werden konnten.

Um die Eigenartigkeit der Beeinflussung der Komplementwirkung durch die Kochsalzkonzentration besser ins Licht zu stellen, werde ich noch einige Beispiele der Beeinflussung der Giftwirkung durch die Salzkonzentration anführen.

Ich will an dieser Stelle auf einen prinzipiellen Unterschied hinweisen, welcher zwischen Giften im engeren Sinne des Wortes und zwischen anderen Substanzen, welche auf Blutkörperchen schädlich wirken, besteht. Meine Versuche über Hämolyse, welche ich an einem anderen Orte mitgeteilt habe<sup>1)</sup>, haben mich zu der Erkenntnis geführt, daß im allgemeinen zwei Formen der Hämolyse voneinander zu unterscheiden sind. Die eine Form der Hämolyse wird durch eine niedrigere Temperatur beschleunigt, das ist die Hämolyse in Wasser und in Salzlösungen. Die andere Form der Hämolyse, die Hämolyse durch Gifte, wird mit der Zunahme der Temperatur bedeutend verstärkt. Die erste Form der Hämolyse wird durch Quellungserscheinungen eingeleitet, welche, wie bekannt, durch die Kälte befördert werden. Die Wirkung der eigentlichen Gifte besteht in der Fällung des Protoplasmas, oder in einem Prozesse, welcher der Fällung nahesteht; diese werden durch die Wärme befördert. Die Erscheinungen der Hämolyse kann man jedoch weder mit der Quellung, noch mit der Fällung vollkommen erklären. Ich schließe mich der Ansicht Ehrlichs an, daß das Eintreten der Hämolyse unter allen Umständen als die Folge des eingetretenen Protoplasmatodes aufzufassen ist. Beim Absterben tritt immer Verflüssigung ein, auch unter dem Einflusse von Giften, welche Fällung erzeugen, vorausgesetzt, daß die Fällung nicht so stark ist, daß eine Härtung des Zelleibes erfolgt.

Wenn es aber zwei Formen der Hämolyse gibt, welche sich in ihrem Verhalten der Temperatur gegenüber unterscheiden, so fragt es sich, wie sich die Blutkörperchen verhalten werden, wenn sie den verschiedenartigen schädlichen Agentien zu gleicher Zeit ausgesetzt sind.

---

1) Das periodische System der Elemente und die Giftwirkung, Leipzig und Wien 1909.

Wir können erwarten, daß hier ganz verschiedene Fälle eintreten können. Es kann geschehen, daß sich an den Blutkörperchen die Schädlichkeiten verschiedener Art einfach summieren. Dies muß aber nicht unbedingt geschehen. Wir wollen dies an einigen Beispielen näher untersuchen. Zu den Giften, welche die einfachste chemische Konstitution besitzen, gehören die anorganischen Säuren und Laugen. Die Wirkung derselben wird mit der Zunahme der Temperatur in ganz besonderem Maße beschleunigt. 0,001 normale Salzsäurelösung bewirkt bei 37° C Temperatur rasch Hämolyse, dieselbe wird durch die Erhöhung der Salzkonzentration nicht verhindert. In höheren Salzkonzentrationen tritt auch eine Eiweißfällung auf. Bei Zimmertemperatur erfolgt dagegen die Hämolyse nur langsam und der Einfluß der Salzkonzentration ist ganz charakteristisch; in den stark konzentrierten und in den stark verdünnten Lösungen erfolgt nämlich die Hämolyse in verhältnismäßig kurzer Zeit, z. B. in 30—50 Minuten; in den mittleren Konzentrationen tritt die Hämolyse später auf und zwischen 1 Proz. und 1,5 Proz. ist überhaupt keine Hämolyse zu beobachten.

Eine 0,001 normale Kalilaugenlösung wirkt bedeutend schwächer als die äquivalente Säurelösung. Die Hämolyse erfolgt bei 37° C Temperatur erst nach Verlauf von mehreren Stunden. Die Beeinflussung durch Salze weist aber ganz analoge Verhältnisse auf, indem in den mittleren Konzentrationen — zwischen 1—2 Proz. Kochsalzgehalt — die schädliche Wirkung der Lauge kompensiert wird.

Die Schutzwirkung des Kochsalzes ist also bei Anwesenheit von anorganischen Säuren und Laugen zwischen denselben Konzentrationsgrenzen die größte, zwischen welchen das Optimum für die Blutkörperchen in reinen Salzlösungen liegt.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei einem Hämolysin pflanzlicher Herkunft, beim Cyclamin. In einer 1-proz. Blutauflösung von 5 ccm Volum erzeugt  $\frac{1}{10}$  mg Cyclamin bei 37° C Temperatur in etwa einer halben Stunde komplette Hämolyse. Der Einfluß der Kochsalzkonzentration ist nicht zu erkennen; in jeder Konzentration erfolgt die Hämolyse, mit gleicher Geschwindigkeit, wenn die Konzentration nicht

allzu niedrig oder stark erhöht ist; solche Lösungen erzeugen nämlich auch ohne jeden fremden Zusatz Hämolyse. Die physiologische Kochsalzlösung zeichnet sich also durch keine Schutzwirkung aus.

Abweichend von den vorigen Stoffen ist das Verhalten des Cobragiftes.

Die gewaschenen Blutkörperchen des Meerschweinchens werden durch das Cobragift gelöst. 2 mg eines getrockneten Giftes lösten 5 ccm 1-proz. Blutaufschwemmung etwa in einer Stunde auf. Die Hämolyse tritt aber in den Gemischen, welche weniger Kochsalz enthalten, rascher auf und wird bei höherem Kochsalzgehalt verzögert. Nach einer Beobachtungsdauer von 6 Stunden ist in dem Gemische mit 3 Proz. Kochsalz totale Hämolyse eingetreten. Bei 4—6 Proz. Kochsalzgehalt ist nach 24 Stunden nur eine schwache Hämolyse zu bemerken. Die Wirkung des Giftes kommt also in konzentrierten Salzlösungen nicht zum Vorschein.

Analog sind die Verhältnisse, wenn die Versuche mit solchen Blutarten, wie z. B. Rinderblutkörperchen, ausgeführt werden, welche erst nach Zusatz eines zweiten Komponenten, wie Lecithin oder Blutserum, durch das Cobragift gelöst werden. Ob also das Cobragift an sich löst, oder erst komplettiert werden muß, die Beeinflussung durch Kochsalz folgt denselben Regeln.

Nun kommen wir an das Problem heran, welches schon Gegenstand unserer Untersuchung bildete, d. i. die Beeinflussung der komplexen Hämolyse durch die Salzkonzentration.

In einer stark konzentrierten Lösung, welche selbst hämolytisch wirkt, bleiben die Blutkörperchen, wie gezeigt wurde, von der Wirkung der zugesetzten starken Blutgifte verschont. Die Eigenartigkeit dieser Verhältnisse kann man noch schärfer hervortreten lassen, wenn man die Versuche nicht nach der üblichen Methode ausführt, wobei man die Blutgemische ruhig stehen läßt. Bei diesem Verfahren findet man nämlich in relativ stark konzentrierten Lösungen keine Hämolyse. In einer Mischung mit 6 Proz. Kochsalz ist keine Hämolyse zu beobachten, wenn das Gemisch ruhig gestanden hat. Schüttelt man dagegen die Gemische während der ersten halben Stunde

einigemal tüchtig um, so entsteht schon mit 3 Proz. Kochsalz eine starke Hämolyse. Eine schwache Hämolyse wird selbst in einer 2-proz. Kochsalzlösung durch starkes Schütteln erzeugt. Nur in den Lösungen von 1,0—1,80 Proz. Kochsalzgehalt wird selbst durch stundenlanges Schütteln keine Hämolyse erzeugt.

Nun kann man aber Hämolysinuntersuchungen systematisch ausführen in Gemischen, welche 2—3 Proz. Kochsalz enthalten. Ganz unabhängig von dem Gehalt der Lösung an den spezifischen Stoffen entsteht sogleich eine Hämolyse, wenn das Gemisch stark geschüttelt wird. Eine Kochsalzlösung, welche starke Hämolyse erzeugt, wenn das Gemisch stark geschüttelt wird, schützt die Blutkörperchen vor der Wirkung des Hämolytins. Es ist aus dieser Tatsache klar, daß hier eine Summierung der schädlichen Einflüsse nicht stattfindet. Das Komplement unterscheidet sich also in dieser Beziehung von den meisten anderen Giften und verhält sich ähnlich wie das Cobragift.

Für die Kenntnis der Natur des Komplementes sind endlich die Versuche Friedbergers<sup>1)</sup> wichtig, in welchen gezeigt wurde, daß das Komplement in hypertonischen Kochsalzlösungen erhalten wird, und daß die Haltbarkeit um so größer ist, je stärker die angewandte Kochsalzkonzentration war. Haltbarkeit und Hemmung der hämolytischen Wirkung werden demnach durch die Kochsalzkonzentration in gleichem Sinne beeinflußt. Da das Optimum für die Erhaltung der Wirksamkeit des Komplementes bloß in den höchsten Konzentrationen (bis 15 Proz. Kochsalz) erreicht wird, so ist es wahrscheinlich, daß die maximale Hemmung der hämolytischen Fähigkeit des Komplementes in einer 3—4-proz. Kochsalzlösung noch nicht erreicht wird. Es läßt sich — wenigstens theoretisch — annehmen, daß äußerst stark wirksame Komplemente selbst in bedeutend höheren Konzentrationen die Blutkörperchen zu hämolysieren vermögen.

In den niedrigeren Konzentrationen entspricht einer jeden Kochsalzlösung ein bestimmtes Minimum des Komplementes. Der physiologischen Kochsalzlösung entspricht ebenfalls eine

---

1) Centralbl. f. Bakt., 1908.

bestimmte Menge des Komplementes und die Kontinuität der Gesetzmäßigkeiten erleidet an dieser Konzentrationsgrenze keine Veränderung. Es ergibt sich somit aus der Betrachtung der quantitativen Verhältnisse für die ausschließliche Anwendung der physiologischen Kochsalzlösung bei den Hämolysinuntersuchungen keine Berechtigung. Die physiologische Kochsalzlösung wird bei den Hämolysinuntersuchungen immer mehr aus Gewohnheit als aus Ueberzeugung verwendet.

Ein einfacher Versuch kann uns überzeugen, daß die Konzentration der physiologischen Kochsalzlösung etwas zu niedrig gewählt ist. Wird Rinderblutserum mit der gleichen Menge destillierten Wassers verdünnt und mit einer kleinen Menge Rinderblutkörperchen versetzt, so beobachtet man in dieser Mischung selbst nach 24 Stunden gewöhnlich bloß eine schwache Hämolyse. Wird dagegen die physiologische Kochsalzlösung auf das Doppelte verdünnt, so entsteht eine Flüssigkeit, welche die Rinderblutkörperchen fast momentan auflöst. Die Schutzwirkung des auf das Doppelte verdünnten Serums ist also einer 0,43–0,45-proz. bedeutend überlegen. Es kann nicht angenommen werden, daß der osmotische Druck infolge der stärkeren elektrolytischen Dissoziation bei der Verdünnung des Serums stärker zunimmt als bei der Verdünnung der reinen Kochsalzlösung; die Schutzwirkung des Serums ist größer und dies aus dem Grunde, weil auch die organischen Bestandteile des Serums, welche den osmotischen Druck nicht beeinflussen, eine Schutzwirkung besitzen. Man dürfte daher eine Kochsalzlösung erst dann mit Recht eine physiologische nennen, wenn dieselbe außer der Salzmenge, welche dem Gehalt an Kochsalz und an den übrigen anorganischen Bestandteilen des Serums entspricht, noch eine bestimmte Menge Salz enthält, welche der Schutzwirkung der organischen Bestandteile entspricht.

Es ist übrigens für die Praxis nicht von Belang, wenn man an der bisher üblichen Konzentration festhält; gegen die Anwendung einer leicht „hypertonischen“, z. B. 1-proz. Lösung wird man wahrscheinlich auch noch kein Bedenken haben. Meiner Ansicht nach hat bei den Hämolysinuntersuchungen die physiologische Kochsalzlösung überhaupt keine andere Funktion, als diejenige, daß verschiedene Forscher ihre



Versuchsergebnisse ohne etwaige Rücksichten auf die Beeinflussung der Hämolyse durch Salze miteinander vergleichen können.

#### Zusammenfassung.

1) Die Beobachtungen, welche bei der Hämolyse von Rinderblutkörperchen unter dem Einflusse von Meerschweinchenserum und eines stark wirkenden Immunsersums gemacht wurden, lassen die Fermentnatur des Komplementes erkennen. Die Erscheinungen, welche für diese Annahme sprechen, sind folgende:

- a) die Hämolyse ist innerhalb weiter Grenzen unabhängig von der Bindung des Komplementes;
- b) für die Geschwindigkeit und Stärke der Hämolyse ist die Konzentration des Komplementes ausschlaggebend und nicht die absolute Menge desselben;
- c) die Komplementwirkung wird durch die Kochsalzkonzentration stark beeinflusst;
- d) die Beeinflussung des Komplementes durch die Salzkonzentration folgt anderen Gesetzen, als die einiger anderen Blutgifte (Salzsäure, Kalilauge, Cyclamin).

2) Es entspricht einer jeden Kochsalzkonzentration ein Minimum des Ambozeptors und des Komplementes. Die Zu- oder Abnahme dieser Minima erfolgt kontinuierlich mit der Zu- oder Abnahme der Salzkonzentration. Ein Ueberschuß des einen der beiden Komponenten verringert den Bedarf des anderen.

3) Es gibt keine Anhaltspunkte für die Annahme einer chemischen Bindung zwischen Ambozeptor und Komplement.

4) Die ausschließliche Anwendung der physiologischen Kochsalzlösung hat keine Berechtigung. Der Mechanismus der Hämolyse ist bei jeder Salzkonzentration der gleiche. Die Unterschiede sind bloß quantitativer Natur.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin;  
Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Im-  
munitätsforschung und experimentelle Therapie, Leiter: Prof.  
Dr. E. Friedberger).]

**Ueber das Verhalten des Komplements bei der aktiven  
und passiven Anaphylaxie.**

Von Prof. Dr. E. Friedberger und Dr. O. Hartoch (St. Petersburg).

Mit Tafel II.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. September 1909.)

Wenn auf irgendeinem wissenschaftlichen Gebiet neue  
Tatsachenkomplexe aufgedeckt werden, so ist es für unsere Er-  
kenntnis keineswegs von vornherein förderlich, daß zu ihrer  
Erklärung ohne Not neue Theorien aufgestellt werden; viel  
eher entspricht es doch der Oekonomie des Denkens, die neuen  
Befunde mit den bereits bestehenden gesicherten Ergebnissen  
in Zusammenhang zu bringen und unter gemeinsamen theore-  
tischen Gesichtspunkten mit diesen zu betrachten. Erst wenn  
dieser Weg nicht mehr gangbar ist und zu keinem Ziele führt,  
ist die Aufstellung von neuen Theorien gerechtfertigt.

Man kann gerade nicht behaupten, daß bei der Forschung  
über die Anaphylaxie dieser natürlichen Forderung Rechnung  
getragen worden wäre, keineswegs zum Nutzen unserer Er-  
kenntnis über das Wesen dieses wunderbaren Phänomens.  
Nicht eine der Theorien, die zur Erklärung der Ueberempfind-  
lichkeit aufgestellt worden sind, vermochte die zahlreichen  
Tatsachen, die die Forschung der letzten Jahre über die  
Anaphylaxie zutage gefördert hat, befriedigend zu deuten.  
Die bisherigen Theorien von Gay und Southard<sup>1)</sup>,  
Richet<sup>2)</sup>, Besredka und Steinhard<sup>3)</sup> waren nichts

1) Gay and Southard, On the mechanism of serum anaphylaxis  
and intoxication in the Guinea pig. Journ. of med. Research, 1908.

2) Richet, De l'Anaphylaxie et des Toxogénines. Annales Institut  
Pasteur, 1908.

3) Besredka et Steinhard, Du mécanisme de l'antianaphylaxie.  
Annales Inst. Pasteur, 1907, Febr.; ibid. 1908.

anderes als komplizierte Umschreibungen der schwer zu deutenden Befunde.

Friedberger<sup>1)</sup> hat dann zum ersten Male den Versuch gemacht, die neuen Beobachtungen in die schon bestehenden Zusammenhänge einzuordnen. Er suchte die Anaphylaxie auf ein Grundprinzip mit den übrigen Immunitätsphänomenen zurückzuführen und mit diesen zusammen unter gemeinschaftlichen Gesichtspunkten zu betrachten. Im Anschluß an seine mit Moreschi<sup>2)</sup> und Bezzola<sup>3)</sup> ausgeführten Versuche über Hämolysebeschleunigung und -verstärkung [vergleiche auch die mit Hartoch<sup>4)</sup> über Beschleunigung der Phagocytose] hat er versucht, die Anaphylaxie ebenso wie diese Erscheinungen in das Eiweiß-Antieiweiß-Phänomen einzuordnen.

Da die Theorie in Bd. II dieser Zeitschrift ausführlich entwickelt worden ist, so erübrigt sich hier ein näheres Eingehen auf sie. Es sei nur noch einmal kurz darauf hingewiesen, daß die Anaphylaxie danach aufgefaßt wird „als eine durch die eigentümlichen quantitativen Verhältnisse und die besondere Lokalisation des Antikörpers bedingte eigentümliche Form der Eiweiß-Antieiweißreaktion<sup>5)</sup> in vivo“. Die Anti-anaphylaxie entsteht nach dieser Theorie dadurch, daß durch eine vorherige partielle Absättigung der die Anaphylaxie bedingenden Rezeptoren die letale Vergiftung bei

1) E. Friedberger, Kritik der Theorien über Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Bd. 2, 1909.

2) Friedberger und Moreschi, Ueber Hämolyse beschleunigende Immunsustanzen. Centralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 45, 1907.

3) Friedberger und Bezzola, Ueber Cytolyse verstärkende Wirkung präzipitierender Sera. Ibid., Bd. 46.

4) Friedberger und Hartoch, Ueber Phagocytosebeschleunigung und -verstärkung. III. Tagung der Freien Vereinigung für Mikrobiologie, Wien 1909.

5) Wir halten Präzipitation und Komplementablenkung nur für verschiedene Erscheinungsformen eines Antikörpers und können die Beweise, die gegen deren Identität angeführt werden, nicht als zwingend ansehen, trotzdem es nun einmal in der Immunitätslehre üblich ist, für jedes Phänomen besondere Körper als dessen Träger anzunehmen. Um Irrtümer zu vermeiden, werden wir also im folgenden ausschließlich die allgemeinere Ausdrucksweise „Eiweiß-Antieiweißreaktion“ beibehalten.

der Reinjektion verhütet wird. Die Antianaphylaxie ist demnach „nichts weiter als eine Anaphylaxie refracta dosi“.

Die passive Anaphylaxie kommt nach Friedberger dadurch zu stande, daß ein im Serum des vorbehandelten Tieres frei kreisender Antieiweißkörper oder, vielleicht unter gewissen Verhältnissen, dessen Vorstufe<sup>1)</sup>, beim passiven Anaphylaxieversuch auf das zweite Tier übertragen wird und sich an dessen Zellen fixiert, wodurch das so behandelte Tier genau dieselbe Ueberempfindlichkeit erlangt wie ein aktiv anaphylaktisches. Die Möglichkeit der Verankerung des Präzipitins an die Zelle ist natürlich die Voraussetzung für das Zustandekommen der passiven Anaphylaxie bei der Reinjektion. Da, wo entsprechende Zellgruppen oder Affinitäten nicht bestehen, so daß die Verankerung des injizierten Antieiweißkörpers unterbleibt, ist auch keine passive Anaphylaxie auslösbar. Das ist wohl der Fall bei der Maus, wie Doerr und Russ<sup>2)</sup> gezeigt haben<sup>3)</sup>. Beim Meerschweinchen dagegen ist offenbar die Affinität der Zellen zum Präzipitin eine besonders starke, wodurch leicht die passive Uebertragung der Anaphylaxie sowohl mit homologem Serum (Otto, Friedemann) als auch mit heterologem (Doerr und Russ) gelingt. Wie bei der aktiven Anaphylaxie von hochempfindlichen Meerschweinchen bis zum wenig empfindlichen Hund und Kaninchen und zur fast refraktären Maus alle Uebergänge vorhanden sind, so mag auch für die passive Anaphylaxie eine ähnliche Skala bestehen.

Alle Tatsachen, die auf dem Gebiete der Anaphylaxie bis heute von zahlreichen Forschern beigebracht worden sind, lassen sich bis zu Einzelheiten mit der Theorie Friedbergers vollkommen befriedigend erklären. Das gilt besonders für die sorgfältige Arbeit von Doerr und Russ,

1) Uebertragung der passiven Anaphylaxie im präanaphylaktischen Stadium beim Meerschweinchen (Otto).

2) Doerr und Russ, Studien über Anaphylaxie. III. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Bd. 3, 1909.

3) Cand. med. Ulm, der unter unserer Leitung entsprechende Versuche angestellt hat, ist es gleichfalls in keiner Weise gelungen, Mäuse durch Vorbehandlung mit Rattenserum anaphylaktisch zu machen (erste Injektion subkutan, zweite Injektion intravenös). Neuerdings ist es allerdings durch besonders intensive Vorbehandlung auch geglückt, Mäuse aktiv zu anaphylaktisieren (Braun, Doerr und Russ).

durch deren in gleicher Richtung unternommenen Versuche die Theorie eine vollkommene Bestätigung erfahren hat. Doerr und Russ bemerken (l. c.) p. 204: „Es ist hier überflüssig, die vorstehenden Versuche zu einer zusammenhängenden Darstellung des Wesens der Anaphylaxie zu verwerten; dieser Mühe sind wir durch Friedbergers Ausführungen (siehe diese Zeitschrift, I. Teil, Bd. 2) enthoben. Die vorliegende Arbeit bildet gewissermaßen den Kommentar zu der Hypothese dieses Autors, wonach die anaphylaktische Reaktion nichts anderes ist als die im Organismus zwischen sessilem Präzipitin und der giftempfindlichen Zelle und präzipitabler Substanz sich vollziehende Reaktion.“

Trotz dieser eindeutigen experimentellen Bestätigung sind in jüngster Zeit von einigen Seiten Einwände gegen unsere Theorie der Anaphylaxie erhoben worden.

Detre<sup>1)</sup> hat auf dem letzten internationalen medizinischen Kongreß in Budapest die Auffassung vertreten, daß entgegen der Ansicht Friedbergers nicht ein an die Zellen verankerter sessiler Antieiweißkörper die Anaphylaxie auslöse. Er meint vielmehr, daß das Antigen selbst bei der ersten Injektion sich an den Zellen verankere und in eine besondere Modifikation umgewandelt, mit dem Eiweiß der Reinjektion eine Verbindung eingehe, welche als auslösendes Moment für die Anaphylaxie in Betracht komme. Eine derartige Deutung ist mit unseren bisherigen Vorstellungen über die Anaphylaxie in keiner Weise in Einklang zu bringen. Sie stützt sich auf gewisse Beobachtungen, die bei einem einzigen an inoperablem Carcinom leidenden Menschen gelegentlich der Behandlung mit Doyenschem Impfstoff erhoben worden sind. Es handelt sich hier aber um fast unkontrollierbare Verhältnisse bei einem Schwerkranken und um einen Impfstoff, über dessen Zusammensetzung und primäre Wirkung wir keine genügenden Kenntnisse besitzen. Es erscheint danach von vornherein sehr bedenklich, auf Grund eines einzigen solchen Falles weitgehende Schlüsse zu ziehen und ihn allein als Ausgangsmaterial für eine neue Theorie zu benutzen. Es liegen demgegenüber doch unzählige Tierversuche vor, die geeignet sind, die Anschauung Detres gründlich zu widerlegen. Wenn

1) Detre, Verhandl. XVI. internat. med. Kongreß, Budapest 1909.

seine Auffassung richtig wäre, so müßte ja, wie bereits Friedberger<sup>1)</sup> in der Diskussion gegenüber Detre hervor- gehoben hat, die passive Anaphylaxie leichter auszulösen sein, wenn man zuerst das Antigen und nachher das Anti- serum einspritzt. Das ist aber nicht der Fall.

Wir wissen vielmehr, daß die passive Anaphylaxie gerade bei Injektion der beiden reagierenden Substanzen in umge- kehrter Reihenfolge am besten entsteht.

Nicolle<sup>2)</sup>, Otto<sup>3)</sup>, Gay und Southard<sup>4)</sup>, Friede- mann<sup>5)</sup>, Lewis<sup>6)</sup> u. a. leugnen überhaupt, daß die Anaphy- laxie unter anderen Bedingungen auszulösen ist.

Rosenau und Anderson<sup>7)</sup> behaupten, daß auch bei Mischung des präzipitierenden Serums mit dem Antigen in vitro oder bei gleichzeitig getrennter Injektion beider Substanzen die Anaphylaxiesymptome ausbleiben, was aller- dings von Weil-Hallé und Lemaire<sup>8)</sup> geleugnet wird. Jedenfalls beweist die geringere Giftigkeit von Präzipitaten (das kann man ja als gleichzeitige Injektion von Antigen und Antikörper ansehen) nach Doerr und Russ, daß die vor- herige Einspritzung des Antiserums bessere Bedingungen liefert. Nur zwei Beobachtungen sind bekannt, wonach auch bei vorheriger Einspritzung des Antigens, die 24 Stunden später erfolgende Reinjektion des Serums lokale Anaphylaxie auslöste [v. Pirquet<sup>9)</sup>, Pick und Yamanouchi<sup>10)</sup>]. Das

1) Friedberger, *ibid.*

2) Nicolle, Contribution à l'étude du phénomène d'Arthus. *Annales Inst. Past.*, 1907.

3) Otto, Zur Frage der Serumüberempfindlichkeit. *Münch. med. Wochenschr.*, 1907.

4) Gay and Southard, *Journ. of med. research*, 1907/08.

5) U. Friedemann, Ueber passive Ueberempfindlichkeit. *Münch. med. Wochenschr.*, 1907.

6) Lewis, The indured. susception of the guinea pig to the toxin action of the blood serum of the horse. *Journ. exp. med.*, Vol. 10, 1908.

7) Rosenau und Anderson, zit. nach Doerr, *Die Anaphylaxie in Kraus-Levaditis Handbuch*, Bd. 2.

8) Weil-Hallé et Lemaire, L'anaphylaxie passive du cobaye pour le sérum de cheval. *Compt. rend. de la Soc. de Biol.*, T. 65, 1908.

9) v. Pirquet, *Klinische Studien über Vaccination und vaccinale Allergie*. Wien (Deuticke) 1907.

10) Pick und Yamanouchi, Studien über Anaphylaxie. *Wien. klin. Wochenschr.*, 1908, No. 44.

mag vielleicht an den besonderen Mengenverhältnissen bei diesen Versuchen gelegen haben.

In zahlreichen, bisher noch nicht veröffentlichten Versuchen haben Doerr und Russ wiederum, wie wir aus einer mündlichen Mitteilung wissen, in Uebereinstimmung mit der großen Zahl der vorerwähnten Autoren jedenfalls den Nachweis erbracht, daß unter den gewöhnlichen Versuchsbedingungen, unter denen die Auslösung der passiven Anaphylaxie bei der Reihenfolge Antiserum-Antigen glatt in 100 Proz. gelingt, sie bei umgekehrter Reihenfolge der reagierenden Substanzen ausbleibt.

Neufeld<sup>1)</sup> hat an gleicher Stelle wie Detré weitere Einwände gegen die Theorie Friedbergers vorgebracht. Schon Friedemann hat vermutet und Doerr und Russ haben es experimentell gezeigt, daß der Gehalt eines Serums an Präzipitin und anaphylaktischem Reaktionskörper in der Regel parallel geht. Dies geht nach Doerr und Russ soweit, daß selbst das bei der Präzipitinreaktion bekannte Uebergreifen von einer Tierspecies auf verwandte Arten genau in gleicher Weise auch bei der Anaphylaxie wieder zum Ausdruck kommen kann. Ein Kaninchen-Antihammeleiweißserum, das in absteigender Intensität bei der Präzipitation Verwandtschaftsreaktion mit Ziege, Schwein, Mensch und Pferd gab, nicht aber mit Huhn, zeigte auch mit der Anaphylaxiereaktion bei passiv behandelten Tieren bezüglich der Intensität die gleiche Skala. Auch läßt sich zeigen, daß mit fortschreitender Immunisierung Präzipitin und anaphylaktischer Immunkörper gleichmäßig wachsen und abnehmen.

Nur in einem Falle beobachteten Doerr und Russ, daß ein nichtpräzipitierendes Serum gleichwohl Tiere passiv anaphylaktisch zu machen imstande war. Daß dieses Serum trotz mangelnder Präzipitationskraft gleichwohl Eiweißantikörper enthielt, ergab die Prüfung auf Komplementablenkung nach Moreschi. Da in diesem Serum auch die anaphylaktisierende Eigenschaft sehr gering ausgesprochen war, so spricht dieser Fall keinesfalls gegen die Kongruenz von Antieiweißkörper und anaphylaktischem Reaktionskörper; sofern wir nur annehmen, worauf wir gleich näher eingehen werden, daß die anaphylaktische Reaktion weit empfindlicher ist als die Prä-

1) Neufeld, Verhandl. des XVI. internat. med. Kongresses, Budapest 1909.

zipitinreaktion in vitro. Trotzdem schließt Neufeld, der wiederholt derartige Sera angetroffen hat, daraus auf eine Verschiedenheit beider Serumqualitäten.

Neufeld hat keine zahlenmäßigen Angaben darüber gegeben, inwieweit diese Inkongruenz in seinen Fällen geht, namentlich auch darüber nicht, ob er jemals stark präzipitierende Sera beobachtet hat, welche passive Anaphylaxie zu übertragen nicht imstande waren. Wenn auch einmal ein Serum, das passiv anaphylaktisch macht, keine sichtbare Fällung im Reagenzglase hervorruft (Doerr und Russ), so ist es noch keineswegs ein Beweis gegen die Identität. Wissen wir doch, daß in Antieiweißseris zwei Qualitäten zu unterscheiden sind, neben der sinnlich wahrnehmbaren Präzipitation jene Form der Eiweiß-Antieiweißreaktion, die nur indirekt durch das Komplementablenkungsverfahren nachweisbar ist. Diese gehen aber keineswegs immer parallel. So hat Friedberger<sup>1)</sup> ein Serum beschrieben, das bei minimaler präzipitierender Fähigkeit mittels der Komplementablenkung den spezifischen Eiweißnachweis noch in Verdünnung von 1:1000000000 gestattete. Abgesehen davon, geht aus diesen Versuchen von Doerr und Russ und Neufeld, die letzterer gegen die Theorie Friedbergers ins Feld führt, wie schon gesagt, nur hervor, daß die passive Anaphylaxie beim Meerschweinchen unter Umständen ein empfindlicheres Reagens für die Eiweiß-Antieiweißreaktion als die Probe auf sichtbare Fällung in vitro, ja sogar vielleicht als die Komplementablenkung in vitro darstellt.

Wir werden übrigens gerade in der vorliegenden Arbeit über Versuche berichten, die unserer Meinung nach zur Evidenz dartun, daß die empfindlichere komplementverankernde Qualität des Antieiweißserums für die Auslösung der passiven Anaphylaxie von wesentlicher Bedeutung ist. Es sei bei dieser Gelegenheit auch als Beweis für die Identität von Anaphylaxie und Antieiweißreaktion in vitro an die von Lemaire zuerst aufgedeckte, von Friedemann bestätigte Tatsache erinnert, daß bezüglich der Anaphylaxie ebenso wie bei der Präzipitation und Komplementablenkung in vitro bestimmte optimale Verhältnisse existieren.

1) Friedberger, Zur forensischen Eiweißdifferenzierung auf Grund der hämolytischen Methode mittels Komplementablenkung usw. Deutsche med. Wochenschr., 1906, No. 15.



Wenn Neufeld behauptet, daß bei der aktiven Anaphylaxie der Termin der optimalen Ueberempfindlichkeit keineswegs mit dem zusammenfällt, an dem man die maximale Ausbeute eines Serums an Präzipitin zu beobachten pflegt, so möchten wir demgegenüber darauf hinweisen, daß nicht das freie Präzipitin, sondern daß gerade das an den Zellen verankerte sessile Präzipitin nach unserer Theorie der Anaphylaxie für die anaphylaktische Disposition ausschlaggebend ist. Es können also füglich nicht die von den bei der Präzipitinbildung abweichenden zeitlichen Verhältnisse bei Entwicklung der Ueberempfindlichkeit zur Beweisführung in irgendeiner Weise herbeigezogen werden.

Einen seiner Meinung nach besonders gewichtigen Einwand erhebt Neufeld dann noch gegen die Deutung, die in der Theorie über Entstehung der passiven Anaphylaxie gegeben wird. Aus den klaren und einheitlichen Versuchsergebnissen von Doerr und Russ sehen wir, daß die passive Anaphylaxie bei intravenöser Einspritzung des präzipitierenden Serums bereits nach 4 Stunden durch eine entsprechende Reinjektion auszulösen ist, während nach 24 Stunden das Optimum erreicht zu sein scheint (bei intraperitonealer Injektion ist das Minimum der Inkubationszeit entsprechend größer).

Nun behauptet Neufeld, daß bei passiver Uebertragung die Antikörper stets noch längere Zeit im Organismus zirkulieren, jedenfalls ohne nachweisbare Abnahme weit über die Zeit hinaus, die zur Ausbildung der passiven Anaphylaxie nötig ist. Das steht jedoch keineswegs mit den Befunden zahlreicher Autoren über das schnelle Verschwinden passiv einverleibter Antikörper im Einklang.

Loos<sup>1)</sup>, der Versuche über das Verschwinden von Diphtherieantitoxin im Körper des Menschen angestellt hat, konnte nach 24 Stunden von 150 IE. nichts mehr nachweisen. Ähnliche Befunde (Tetanusantitoxin) liegen vor von Vagedes<sup>2)</sup>, Nocard<sup>3)</sup>, Jörgensen und Madsen<sup>4)</sup>

1) Loos, Jahrb. f. Kinderheilk., N. F., Bd. 42, 1896.

2) Vagedes, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 20, 1895.

3) Nocard, Journ. de Cong. méd., 1896, No. 44/45.

4) Jörgensen and Madsen, The fate of typhoid and cholera agglutinins during active and passive Immunisation. Salomonsen Festschrift, Kopenhagen 1902.

(Agglutinine). Kraus und Joachim<sup>1)</sup> stellten fest, daß bei Kaninchen und Meerschweinchen bereits nach einer Stunde ein Verlust von passiv einverleibtem Antitoxin zu verzeichnen war, der bei den einzelnen Versuchstieren zwischen 15 und 61 Proz. schwankte. Ebenso schnell erfolgte der Verlust an Agglutininen. Bezüglich der bakteriolytischen Immunkörper hat Pfeiffer<sup>2)</sup> den völligen Schwund von 300 000 einem Menschen subkutan injizierten Immunitätseinheiten Cholera-ziegerserums innerhalb von 24 Stunden beobachtet.

Pfeiffer und Friedberger<sup>3)</sup>, die in genauen quantitativen Versuchen den Verbleib bakteriolytischer Antikörper beim Kaninchen und Meerschweinchen bestimmten, fanden gleichfalls ein ungemein früh einsetzendes Verschwinden der Antikörper. So waren nach einer Stunde bei einem Kaninchen, das intravenös pro Gramm Körpergewicht die große Menge von 10 IE. Choleraimmunserum erhalten hatte, nur noch 53 Proz., nach 19 Stunden sowohl bei Verwendung von homologem wie heterologem Immunserum nur noch 27 Proz. nachweisbar. Ein Meerschweinchen, das 12 000 IE. Cholera-ziegerserum erhalten hatte (pro Gramm 48 IE.), besaß nach 14 Stunden nur noch 12,5 Proz. Bei einer Dosis von 1 IE. pro Gramm Körpergewicht war nach 24 Stunden von Antikörpern fast nichts mehr zu finden.

Wir haben diese Versuche hier in extenso mitgeteilt, um zu zeigen, daß doch ein Teil der passiv einverleibten Antikörper sehr schnell dem Kreislauf entzogen wird. Wenn wir bedenken, wie groß die in diesen Versuchen verwendeten Mengen von Antikörpern waren und welche geringe Mengen von Antieißserum zur Präparierung für die passive Anaphylaxie notwendig sind, so können wir wohl mit Recht annehmen, daß innerhalb der von Doerr und Russ ermittelten Zeiten Quantitäten von Antikörpern dem Kreislauf entzogen und an die Zellen fixiert werden, die hinlänglich zur Präparierung für die passive Anaphylaxie genügen. In eigens in dieser Richtung unternommenen und bisher noch nicht veröffentlichten Versuchen

1) Kraus und Joachim, Wien. klin. Wochenschr., 1903, No. 50.

2) Pfeiffer, zit. nach Pfeiffer und Friedberger.

3) Pfeiffer und Friedberger, Ueber den Verbleib der bakteriolytischen Immunkörper im tierischen Organismus nach der passiven Immunisierung. Central. f. Bakt., Bd. 37, 1904.

konnten Doerr und Russ zeigen, daß auch von eingespritztem Präzipitin innerhalb von 24 Stunden Mengen aus dem Organismus völlig verschwinden, die weit größer sind als die, welche zur Präparierung für die passive Anaphylaxie genügen. Nach allen diesen Tatsachen scheint der Einwand Neufelds nicht berechtigt.

Unsere ursprüngliche Auffassung, daß die Anaphylaxie nichts weiter als eine besondere Form der Eiweiß-Antieiweißreaktion in vivo darstellt, ist durch die Einwände von Detre und Neufeld also keineswegs erschüttert.

Das um so weniger, als wir in der Lage sind, neues gewichtiges Beweismaterial für unsere Theorie beizubringen<sup>1)</sup>, über das wir im nachstehenden ausführlich berichten wollen.

Wenn wir das Sensibilisin im Sinne Besredkas für identisch halten mit dem Antieiweißkörper und das Sensibilisinogen und Antisensibilisin für identisch mit dem Antigen, mit anderen Worten, Anaphylaxie und Antieiweißreaktion als analoge Vorgänge ansehen, so liegt es nahe, die Einzelphänomene des Reagenzglases auch bei den Verhältnissen im Organismus zu studieren. Bei der Eiweiß-Antieiweißreaktion im Reagenzglas kommen 2 Phänomene in Betracht: 1) die eigentliche Präzipitation, die sichtbare Niederschlagsbildung, die jedoch nur bei geeigneten Mengenverhältnissen (relativ starkes Serum) in Erscheinung tritt und 2) die Komplementverankerung in Gegenwart eines entsprechenden Normalserums, die wir mit weit empfindlicherer Methode nachweisen können. Spielt nun diese Komplementverankerung als Folge der Eiweiß-Antieiweißverbindung auch bei der Reaktion im Organismus, id est bei der Anaphylaxie eine Rolle? Daß bei der Eiweiß-Antieiweißreaktion im Organismus etwa die Präzipitate als solche dadurch, daß sie in den Kapillaren grob mechanisch Embolien hervorrufen, den Symptomenkomplex der Anaphylaxie auslösen, wie das

1) Auch Braun bringt in einer soeben erschienenen Arbeit (Münch. med. Wochenschr., No. 37) wichtige Tatsachen, die die Theorie Friedbergers stützen. Diphtherietoxin, das die Ausbildung der Anaphylaxie begünstigt, wirkt auch begünstigend auf die Bildung von Präzipitin. Mit Ambozeptor beladene Pneumokokken entziehen entsprechenden Antieiweißseris das Präzipitin und in gleicher Weise dem anaphylaktischen Reaktionskörper.

früher Hamburger und Moro<sup>1)</sup>, Marfan und Le Play<sup>2)</sup> sowie Rovere<sup>3)</sup> annahmen, ist mit den Tatsachen keineswegs in Einklang zu bringen. Der direkte experimentelle Beweis dagegen ist durch Versuche gegeben, die in jüngster Zeit von Friedemann, Doerr und Russ, Uhlenhuth und Händel<sup>4)</sup> sowie durch uns ausgeführt worden sind. Wenn Präzipitate im oben angegebenen Sinne wirken könnten, so müßte jedes stark präzipitierende Serum imstande sein, unter geeigneten Versuchsbedingungen passive Anaphylaxie zu erzeugen, und zwar proportional seinem Präzipitingehalt.

Wenn das auch im allgemeinen zuzutreffen scheint, so haben doch gerade Doerr und Russ ein Serum, das wir schon erwähnt haben, beschrieben, das bei mangelndem Präzipitingehalt in vitro noch Tiere anaphylaktisch zu präparieren imstande war. Dann aber haben Uhlenhuth und Händel gezeigt, daß man Meerschweinchen nicht anaphylaktisch machen kann mit hochwirksamem präzipitierenden Serum von Huhn, und wir konnten unsererseits zeigen, daß in analoger Weise ein bei Meerschweinchen hochwirksames Kaninchen-Antihammelserum bei Vögeln (Hühner und Tauben) gänzlich versagte.

Wenn ein der Niederschlagsbildung in vitro analoger Vorgang in vivo als einziges die Anaphylaxie auslösendes Moment in Frage käme, so wäre dieser Befund nicht verständlich. Er erklärt sich aber vollständig befriedigend auf Grund anderer Tatsachen, auf die wir sogleich zu sprechen kommen.

Wir haben soeben auf die Bedeutung der Komplementverankerung bei der Eiweiß-Antieiweißreaktion hingewiesen. Sie tritt natürlich in vitro nur dann auf, wenn wir künstlich entsprechendes komplementhaltiges Serum dem Eiweiß-Antieiweißgemische hinzufügen. Im Organismus sind dagegen a priori

1) Hamburger und Moro, Ueber die biologisch nachweisbaren Veränderungen des menschlichen Blutes nach Seruminjektion. Wien. klin. Wochenschr., 1905, No. 15.

2) Marfan und Le Play, Recherches sur la pathogénie des accidents sérotherapeutiques. Bull. Soc. med. d. Hôpitaux, 1904, 24. März.

3) Rovere, Sur la présence des précipitines dans le sang de sujets atteints d'accidents consécutifs à des inject. d. sér. antidiphth. Arch. génér. d. Méd., 1905.

4) Uhlenhuth und Händel, Ueber nekrotisierende Wirkung normaler Sera, speziell des Rinderserums. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie, Bd. 3, 1909, H. 3.

die Bedingungen für diese Komplementverankerung vorhanden. Es erschien deshalb für unser Bestreben, weitere Aufschlüsse über das Wesen der Anaphylaxie zu erlangen, von Interesse, systematisch das Verhalten des Komplements beim aktiv und passiv anaphylaktischen Tier vor, während und nach der Anaphylaxie unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen.

Bereits in seiner ersten Arbeit<sup>1)</sup> hat Friedberger auf Grund der Analogie der Anaphylaxie mit dem Beschleunigungsphänomen vermutet, daß die Komplementverankerung für die Anaphylaxie von Bedeutung sei.

Doch lagen über diese Frage, die durch die Antieiweißtheorie der Anaphylaxie ein erhöhtes Interesse gewonnen hat, bisher nur spärliche und sich zum Teil widersprechende Angaben vor. Nicht einmal darüber war eine Uebereinstimmung der Anschauungen vorhanden, ob das Serum eines aktiv anaphylaktisch gemachten Tieres bei Hinzutreten des entsprechenden Antigens imstande ist, Komplement abzulenken, also Eiweißantikörper enthält. A priori war es zu erwarten, daß, wenn auch entsprechend der eigentümlichen Art der Vorbehandlung keine freien Präzipitine in vitro nachzuweisen waren (Niederschlagsbildung), wohl aber die empfindlichere Komplementreaktion in Erscheinung treten würde. Otto sowie Sleeswijk<sup>2)</sup> haben gleichwohl nichts davon beobachtet. Nicolle und Abt<sup>3)</sup> haben aber in zahlreichen Versuchen den Eiweißantikörper im Serum von Meerschweinchen, die gegen Hunde- und Pferdeserum anaphylaktisch gemacht worden waren, im Zeitraum von 14 Tagen bis 2½ Monaten nach der Vorbehandlung durch das Komplementablenkungsverfahren, nicht aber durch die sinnlich wahrnehmbare Präzipitinreaktion nachweisen können. Es dürfte daher nach den gründlichen Untersuchungen von Nicolle und Abt kein Zweifel darüber bestehen, daß das Serum aktiv anaphylaktischer Tiere komplementverankernde Eiweißantikörper enthält, und daß sie unter geeigneten Bedingungen auch nachweisbar sind.

1) E. Friedberger, Kritik der Theorien über Anaphylaxie. *Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Ther.*, Bd. 2, 1909.

2) Sleeswijk, Untersuchungen über Serumhypersensibilität. *Zeitschr. für Immunitätsforsch. u. exp. Ther.*, Bd. 2, 1909.

3) Nicolle et Abt, Les anticorps des alb. et des cellules. *Annales Inst. Past.*, 1908.

Wichtiger als diese von vornherein zu erwartende Tatsache ist aber die Frage, welches Verhalten das Komplement des anaphylaktischen Tieres selbst vor, während und nach der Anaphylaxie zeigt. Otto leugnet eine Komplementverankerung im Anschluß an den anaphylaktischen Shock. Sleeswijk dagegen behauptet, daß bei aktiv anaphylaktischen Meerschweinchen die Reinjektion von einer Komplementverarmung im Organismus gefolgt sei, die nach seinen Untersuchungen nach 5 Minuten noch keineswegs ausgesprochen ist, sondern erst im Verlauf einer halben Stunde sich voll ausbildet.

Auch wenn schon frühzeitig akuter Tod infolge der Anaphylaxie eintritt, ist die Komplementverarmung nach Sleeswijk nicht gleich zu konstatieren. Man soll vielmehr dann beobachten können, daß bei dem während des anaphylaktischen Stadiums entnommenen Serum der Komplementschwund gleichfalls erst im Verlauf einer halben Stunde sich noch *in vitro* ausbildet.

Daraus folgert Sleeswijk, von seinem Standpunkte aus mit Recht, „daß die Vergiftungserscheinungen nicht die Folge des Alexinverlustes sind“. Wir wollen hier gleich vorwegnehmen, daß unsere Resultate mit denen von Sleeswijk nicht übereinstimmen. Wenn wir in weit über 1000 Komplementtitrationsversuchen an weit über 100 Meerschweinchen konstant eine Komplementverarmung direkt im Anschluß an die Reinjektion sowohl bei aktiv wie bei passiv anaphylaktisierten Tieren beobachtet haben, so möchten wir die abweichenden Resultate von Sleeswijk neben Differenzen in der angewandten Anaphylaxietechnik vor allem darauf zurückführen, daß er, wie aus der Arbeit hervorgeht, keine quantitativen Komplementbestimmungen vorgenommen hat.

Wir haben unsere Versuche an aktiv und passiv anaphylaktisierten Meerschweinchen und Kaninchen unter Anwendung genauester quantitativer Methoden angestellt. Zur aktiven Präparierung wurden die Meerschweinchen mit 0,01 (in 1 ccm Vol.) Rinder- resp. Hühnerserum subkutan in der Brustgegend geimpft — die Reinjektion erfolgte 12—18 Tage später ausnahmslos in die freigelegte Jugularis. Die intravenöse Injektion zogen wir wegen der Konstanz der Resultate und des deutlicher ausgesprochenen Symptomkomplexes vor. Die Technik ist zwar etwas komplizierter als die der intraperitonealen Injektion, aber bei einiger Uebung doch nicht allzu zeitraubend. Als zweckmäßigstes

Verfahren erwies sich uns das folgende: Es werden 3 Schlingen um eine freigelegte Partie des Gefäßes gelegt; während die peripher liegende Schlinge zugezogen wird, wird gleichzeitig unter der zentralen das Gefäß abgeklemmt, dann wird mittels der mittleren Schlinge die eingeführte Kanüle eingebunden, die Klemme abgenommen und das Serum injiziert. Nach der Injektion wird die untere Schlinge zugebunden und die Kanüle entfernt. Auf diese Weise wird jede Blutung vermieden, was bei der Kleinheit der Versuchstiere natürlich nicht ohne Bedeutung ist. Bei diesen Operationen erfreuten wir uns ständig der liebenswürdigen Assistenz des Herrn cand. med. Ulm, dem wir dafür zu großem Dank verpflichtet sind.

Die Dosis der Reinjektion variierte, wie aus den Tabellen hervorgeht, innerhalb weiter Grenzen, das eingespritzte Flüssigkeitsvolumen betrug aber stets 0,5 bis 1,0 ccm.

Bei der passiven Anaphylaxie wurden die Tiere intraperitoneal meist mit 1 ccm präzipitierendem Serum vorbehandelt. Die Reinjektion erfolgte nach 18 bis 24 Stunden, gleichfalls intravenös, entsprechend der oben angegebenen Technik.

Bei den Kaninchen geschah die Vorbehandlung durch intravenöse Injektionen von 1,0 Serum pro Kilo Tier; nach 14 Tagen bis 4 Wochen wurde die gleiche Dosis nochmals intravenös resp. intraperitoneal gegeben, 8 Tage später folgte dann die Injektion von 3 ccm und mehr homologen Serums intravenös zur Auslösung der Symptome. Es ist das der Immunisierungsmodus, den Friedemann<sup>1)</sup> für die Blutkörperchenanaphylaxie zur Präparierung empfohlen hat.

Bei einer Reihe von Versuchen, welche wir an Tauben anstellten, wurde die Vorbehandlung in analoger Weise wie bei den Meerschweinchen vorgenommen, die Reinjektion erfolgte in die freigelegte Flügelvene.

Um das zur Komplementtitration nötige Blut unmittelbar vor sowie zu verschiedenen Zeiten nach der Reinjektion entnehmen zu können, wurde bei den Tieren eine Carotis freigelegt, peripher unterbunden und zentral abgeklemmt. Durch eine Scherenöffnung innerhalb des abgeklemmten Stückes konnte dann durch Lüftung der Klemme zu beliebigen Zeiten

1) U. Friedemann, Weitere Untersuchungen über den Mechanismus der Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therapie, Bd. 2, 1909, Heft 5.

Blut entnommen werden. Natürlich sind die Serummengen, welche auf diese Weise vom Meerschweinchen mehrere Male hintereinander gewonnen werden können, nur sehr gering. Um mit ihnen eine quantitative Komplementbestimmung überhaupt durchführen zu können, ist es nötig, bei der Titration große Ambozeptorüberschüsse zu nehmen, weil ja erfahrungsgemäß mit zunehmender Ambozeptordosis die zur Komplettierung notwendige Komplementmenge sinkt [Morgenroth und Sachs<sup>1)</sup>]. Dadurch, daß wir gleichzeitig mit dem Ueberschuß an Ambozeptor die Konzentration der Blutaufschwemmung verringerten und anstatt der üblichen 5-proz. eine 2½-proz. wählten, hatten wir eine weitere Möglichkeit, mit relativ geringen Komplementmengen eine genaue quantitative Komplementbestimmung vorzunehmen. Im einzelnen gingen wir bei der Komplementtitration so vor, daß wir zu fallenden Mengen des Meerschweinchenserums in 1 ccm Vol. je 1,0 Blutkörperchenaufschwemmung und 1 ccm Ambozeptorverdünnung hinzufügten, natürlich in einzelnen Versuchsreihen immer mit der gleichen Ambozeptorverdünnung und der gleichen Blutaufschwemmung arbeitend. Als Ambozeptor benutzten wir ein inaktiviertes Kaninchen-Hammelblutserum, später ein Kaninchen-Ziegenblutserum, beide hatten den Titer von 1 mg. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:20 verwandt, es enthielt jedes Versuchsröhrchen also etwa 50 Ambozeptoreinheiten. Die Komplementtitration geschah möglichst noch am Tage der Blutentnahme, spätestens aber nach 12—18 Stunden, nachdem die Röhrchen inzwischen zur Ausscheidung des Serums im Dunkeln bei niedrigerer Temperatur gestanden hatten.

Bei unserer Versuchsanordnung (Verwendung großer Ambozeptorüberschüsse) ist die Titergrenze außerordentlich scharf abzulesen, wobei man als Komplementtiter die geringste Serummenge bezeichnet, die zur kompletten Hämolyse ausreicht.

Sowohl bei der Gewinnung des Serums durch Zentrifugierung, aber auch bei der spontanen Ausscheidung, beobachteten wir in Uebereinstimmung mit Sleeswijk, daß das während des anaphylaktischen Stadiums entnommene

1) Morgenroth und Sachs, Ueber die quantitativen Beziehungen von Ambozeptor, Komplement und Antikomplement. Berl. klin. Wochenschrift, 1902, No. 35.



Serum jedesmal intensiv gerötet war, während das Serum vom Normaltier oder das vor der Reinjektion bei anaphylaktisch präparierten Tieren gewonnene Serum keinen oder einen ganz beträchtlich geringeren Hämoglobingehalt aufwies. Sleeswijk sieht in dieser Tatsache den Ausdruck einer Zellschädigung als Folge der Anaphylaxie. Wir möchten dem zustimmen und sind speziell der Meinung, daß die Verhältnisse sich so erklären lassen, daß beim anaphylaktischen Tier die sessil fixierte Eiweiß-Antieißverbindungen einen Teil des Meerschweinchenkomplementes verankert, wodurch bis zu einem gewissen Grade eine Autohämolyse zustande kommt (vergl. das Phänomen der Hämolysebeschleunigung und Verstärkung: Friedberger, Moreschi, Friedberger-Bezzola).

Im nachstehenden bringen wir zunächst die Versuche über das quantitative Verhalten des Komplementes bei aktiv anaphylaktischen Tieren.

#### Versuch am aktiv anaphylaktischen Kaninchen.

##### I. Versuch.

Kaninchen No. 40, 1400 g.

Vorbehandlung: 7. VII. 1,0 Hammelserum pro Kilo intravenös.

21. VII. die gleiche Dosis intravenös.

Reinjektion am 29. VII. 3,0 Hammelserum pro Kilo Tier.

Es trat deutliche Anaphylaxie ein, die jedoch nicht zum Tode führte. Bei diesem Tiere wurde Blut entnommen:

A. vor der Reinjektion	E. 8 1/2 Min.
B. sofort	F. 14 Min.
C. 1/2 Min.	G. 20 Min. nach der Reinjektion.
D. 2 Min.	

Die Sera wurden alle gleichzeitig unter Verwendung eines Ueberschusses von Kaninchen-Hammelblutambozeptor (100 E.) und 5 Proz. Hammelblut auf Komplementgehalt austitriert, wie die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle I.

	Dosen des zugesetzten Komplementes			
	0,5	0,3	0,2	0,1
A.	+ <sup>1)</sup>	+	± <sup>1)</sup>	— <sup>1)</sup>
B.	±	—	—	—
C.	—	—	—	—
D.	—	—	—	—
E.	—	—	—	—
F.	—	—	—	—
G.	+	—	—	—

1) + bedeutet in dieser und allen folgenden Tabellen komplette Hämolyse, ± fast komplette Hämolyse, — Kuppe oder keine Hämolyse.

Diese Tabelle ergibt, daß unmittelbar nach der Reinjektion bezw. dem Ausbruch der anaphylaktischen Symptome beim aktiv präparierten Kaninchen eine ganz bedeutende Abnahme des Komplementes eintritt, die wenigstens 20 Minuten lang anhält. Ein ähnlicher Komplementschwund bei mit Eiweiß präparierten Kaninchen haben bereits Fleischmann und Michaelis<sup>1)</sup> beobachtet.

Die geringe Disposition der Kaninchen für die Anaphylaxie, die sich namentlich darin ausspricht, daß keineswegs immer der anaphylaktische Shock sehr ausgeprägt ist und die Tiere erliegen, und fernerhin die Tatsache, daß der geringe physiologische Komplementgehalt des Kaninchenserums diese Tiere für Komplementversuche wenig geeignet erscheinen läßt, veranlaßte uns, trotz der bequemen Möglichkeit der Blutentnahme aus dem Ohre von dieser Tierspecies abzusehen und die weiteren Versuche ausschließlich an Meerschweinchen anzustellen. Hier haben wir eine Tierspecies, bei der es fast in 100 Proz. der Fälle gelingt, den anaphylaktischen Tod mit ungemein ausgesprochenem Symptomenbild zu erzielen. Wenn auch bei kleineren Tieren die mehrmalige Blutentnahme gewisse Schwierigkeiten bereitet, so wird das doch wieder völlig aufgehoben durch den kolossalen Komplementreichtum, den das Meerschweinchen im Vergleich zum Kaninchen aufzuweisen hat. Zudem bestand für uns die Möglichkeit, bei Versuchen, in denen eine häufigere Entnahme von großen Blutmengen erforderlich war, ausgewachsene Tiere von 600 bis 1000 g Gewicht zu nehmen, die unserer Erfahrung nach unter Einhaltung entsprechender quantitativer Verhältnisse in ihrer Eignung für Anaphylaxieversuche kleineren Tieren keineswegs nachstehen.

### Versuche an aktiv anaphylaktischen Meerschweinchen.

#### II. Versuch.

Eine Serie von Meerschweinchen wurde am 29. VII. mit je 0,01 ccm Rinderserum subkutan in der Gegend des Sternums geimpft.

Am 12. VIII. wurden diese Tiere mit frischem Rinderserum reinjiziert, und zwar in Dosen, die in den einzelnen Versuchen zwischen 0,02—0,2 ccm

1) Fleischmann und Michaelis, Ueber experimentell in vivo erzeugten Komplementschwund. Med. Klinik, 1906, p. 21.

in 0,5 Volum schwankten. Die erste Blutentnahme geschah unmittelbar vor der Reinjektion, die zweite nachher, in keinem Falle aber vor der vollen Ausbildung der anaphylaktischen Symptome. Die Zeitintervallen liegen so zwischen 1 bis 5 Minuten nach der Reinjektion. Da wir einen Rückgang des Komplementgehaltes des Serums auf Grund früherer Versuche erwarten durften, so haben wir, um mit möglichst großen Dosen Serum arbeiten zu können, die Tiere bei der zweiten Entnahme meistens entblutet. Die Titration der Sera geschah nach der oben angegebenen Methode noch am Tage der Entnahme. Die Resultate der Komplementtitration sind in der Tabelle II enthalten.

Tabelle II.  
Blutentnahme zur Komplementtitration vor und nach der Reinjektion.

Meersch.-No.	Gewicht in g	Dosis d. Reinjekt. (Rinderserum)	Blutentnahme	Hämolyse mit Komplement- mengen in 1 ccm Volumen							Absolute Abnahme pro ccm in Kompl.-E.	Abnahme in Proz. ca.	
				0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02			
75	200	0,02	vorher nachher 5—5½'	+	+	+	+	+	+	—	8	32	Beginn d. Anaphylaxie nach 1 Min. Blut- entnahme in vivo
74	220	0,05	vorher nachher 2—4'	+	+	+	±	—	±	—	7	40	Beginn d. Anaphylaxie nach 1¼ Min. Blut- entnahme in vivo
73	200	0,2	vorher nachher 1'	+	+	+	+	+	±		8	32	Beginn deutlicher Ana- phylaxie bereits nach 30 Sek. Sofort. Blut- entnahme in vivo
78	220	0,2	vorher nachher 1—2'	+	+	+	+	+	—	—	8	32	Deutliche Anaphylaxie nach 1 Minute. So- fortige Blutentnahme in vivo
81	220	0,2	vorher nachher 2'	+	+	+	—	—	—	—	15	60	Deutliche Anaphylaxie. Beginn nach 1½ Min. Blutentnahme in vivo

Wir sehen, daß in allen Fällen eine Komplementverarmung als Folge der Reinjektion bzw. der Anaphylaxie eintritt. Diese Komplementverarmung ist nicht immer sehr beträchtlich. Im höchsten Falle beträgt der Schwund nur etwa 15 E. pro 1 ccm. Eine direkte Abhängigkeit der Komplementverarmung von der Reinjektionsdosis tritt nicht deutlich hervor. Bei 0,02 Rinderserum (Tier No. 75) ist der Schwund nicht größer als bei 0,2 (Tier No. 78). Der Komplementschwund scheint fast

momentan aufzutreten und im wesentlichen im Verlauf des anaphylaktischen Zustandes nicht mehr erheblich zuzunehmen, denn wir sehen nach einer Minute (bei Tier No. 73) dieselbe Differenz wie bei No. 75 nach 5 Min., allerdings bei nicht konstanter Dosis des Reinjektionsserums. Eine wesentlich spätere Blutentnahme war in diesen Versuchen nicht möglich, weil die Tiere, wie es sich aus unseren zahlreichen Kontrollen ergab, spätestens nach 6 bis 8 Minuten der Anaphylaxie ohnehin erlagen.

## III. Versuch.

2. VIII. 10 Meerschweinchen werden wie die vorige Serie subkutan mit je 0,01 Rinderserum vorbehandelt.

Reinjektion am 16. VIII. mit frischem Rinderserum in Dosen zwischen 0,1 bis 0,4 in 0,5 Gesamtvolum.

Blutentnahme vor und nach der Reinjektion nach voller Ausbildung der anaphylaktischen Symptome. Das Zeitintervall betrug in den einzelnen Versuchen 3—6 Minuten.

Tabelle III.  
Komplementtitration am 16. VIII.

Meerschw. No.	Gewicht in g	Dosis d. Reinjekt. (Rinderserum)	Blut- entnahme	Hämolyse mit Komplementmengen in 1 ccm Volumen									Absolute Abnahme pro ccm in Kompl.-E.	Abnahme in Proz. ca.	
				0,3	0,2	0,1	0,05	0,06	0,04	0,02	0,01	0,008			
97	215	0,1	vorher nachher 3—4'	+	+	+	+	+	+	+	—	—	25	50	Sehr starke Ana- phylaxie. Be- ginn 1' post re- inject. Blutent- nahme in vivo
98	220	0,2	vorher nachher 6½'		+	+	+	+	0,03	+	+	—	67	67	Starke Anaphy- laxie. Beginn 2½' post rein- ject. Blutent- nahme in vivo
96	200	0,3	vorher nachher 6—7'			+	+	+	+	+	±	—	>40	>80	Deutliche Ana- phylaxie. Be- ginn 4' post re- inject. Blutent- nahme in vivo
93	220	0,4	vorher nachher 4—5'	+	+	+	+	+	+	+	±	—	25	50	Starke Anaphy- laxie. Beginn 1½' post rein- ject. Blutent- nahme in vivo

Das Resultat dieser Versuchsreihe deckt sich vollkommen mit dem der Versuchsreihe II. Komplementabnahme in jedem Falle ohne deutlich sichtbare Abhängigkeit von der Dosis der Reinjektion und der Zeit der Blutentnahme darnach. Bei diesen Tieren bestanden beträchtliche individuelle, von der Dosis der Reinjektion unabhängige Unterschiede in dem Grade der Krankheitssymptome. Davon scheint aber die Intensität des Komplementschwundes unabhängig zu sein, denn gerade bei dem Tier, das die stärkste Anaphylaxie gezeigt hatte (No. 97), war der Komplementschwund sehr gering (ca. 25 E. pro 1 ccm), während No. 96 mit relativ mildem Verlauf der Anaphylaxie eine Komplementverarmung von ca. 40 E. pro 1 ccm zeigte.

#### IV. Versuch.

30. VII. 10 Meerschweinchen werden mit 0,01 Hühnerserum subkutan geimpft.

Am 13. VIII. resp. 14. VIII. Reinjektion mit frischem Hühnerserum in Dosen von 0,2 bzw. 0,3. Blutentnahme vor der Reinjektion und nachher wie bei den vorigen Versuchen.

Bei diesen Tieren, bei denen die anaphylaktischen Symptome zum Teil weniger intensiv ausgesprochen waren, konnte die zweite Blutentnahme wiederholt länger hinausgeschoben werden, sie schwankt demnach zwischen 2 $\frac{1}{2}$ , bis 17 Minuten. Zur Komplementtitration wurde ein Kaninchen-Ziegenambozeptor (ca. 50 E.) benutzt, worauf sich wohl die etwas höheren Komplementwerte zurückführen lassen (s. Tabelle IV p. 601).

In Uebereinstimmung mit Versuchsreihe II und III sehen wir auch hier als konstanten Befund die Komplementverarmung. Sehr deutlich zeigt sich die Unabhängigkeit des Komplementtitors von der Zeit der Entnahme nach der Reinjektion. Bei Entnahme nach 5' (No. 91) ist der Komplementtiter um 45 E. pro 1 ccm, bei Entnahme 15' nach der Reinjektion zwar um 150 E. pro 1 ccm (Tier No. 84), nach 17' (No. 85) dagegen wieder nur um 100 E. gesunken. Auch die Unabhängigkeit von der Stärke der anaphylaktischen Symptome tritt wiederum deutlich hervor; beim Tier No. 88, welches die stärkste Anaphylaxie aufwies, beträgt die Abnahme nur 88 E., während das eben erwähnte Tier No. 84 bei einer Abnahme von 150 E. nur leichte anaphylaktische Symptome gezeigt hatte. Wir haben denselben Befund der Komplementverarmung bei

Tabelle IV.

30. VII. Meerschweinchen No. 84, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92 mit je 0,01 Hühnerserum subkutan geimpft. — 13. VIII. und 14. VIII. Reinjektion (No. 91) mit den in der Tabelle angegebenen Dosen in 0,5 Gesamtvolumen. Blutentnahme zur Komplementtitration vor und nach der 2. Injektion. Komplementtitration am 14. VIII. mit Kan.-Ziegenambozeptor und 2 $\frac{1}{2}$  Proz. Ziegenblut.

Meersch. No.	Gewicht in g	Dosis d. Reinjekt. (Hühnerserum)	Blut- entnahme	Hämolyse mit Komplementmengen in 1 cem Volumen									Absol. Abnahme pro cem in Kompl.-E.	Abnahme in Proz. ca.		
				0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,008				0,006
84	200	0,2	vorher nachher 15'			++	++	++	+	+	+	+	+	> 153	92	Leichte Anaphylaxie. Beginn gleich nach der Reinjektion. Blutentnahme in vivo
85	150	0,2	vorher nachher 17'	+	+	++	++	++	++	+	+	+	—	100	80	Leichte Anaphylaxie. Beginn 5' post reinject. Blutent- nahme in vivo
91	150	0,2	vorher nachher 5'		+	++	+	+	+	+	+	+		> 45	90	Deutliche Anaphylaxie. Be- ginn 2' post reinject. Blut- entnahme in vivo
86	150	0,3	vorher nachher 4'	+	+	++	++	++	++	+	+	+		> 25	50	Starke Anaphylaxie. Beginn 2' post reinject. Blutent- nahme in vivo
87	200	0,3	vorher nachher 4'	+	+	++	++	++	++	+	+	+	—	100	80	Starke Anaphylaxie. Beginn 1' post reinject. Blutent- nahme in vivo
88	180	0,3	vorher nachher 3—4'	+	+	++	++	++	++	+	+	+	—	83	17	Kolossal starke Anaphylaxie. Beginn 2' post reinjection. Blutentnahme in vivo
90	200	0,3	vorher nachher 2 $\frac{1}{2}$ '	+	+	+	+	+	+	+	+	+				Kolossal starke Anaphylaxie. Beginn 1' nach der Reinjekt. Blutentnahme in vivo
92	150	0,3	vorher nachher 12 $\frac{1}{2}$ '	+	+	++	++	++	++	+	+	+	—	75	25	Versuch nicht ganz rein. Siehe Text
Kon- trolltier			nachher 5'			+	+	+	+	+	+	+	+			

aktiv anaphylaktischen Tieren noch in zahlreichen Fällen erhoben, es erübrigt sich aber wohl, bei der Konstanz der Resultate weitere Versuche mitzuteilen.

Es ist bereits erwähnt, daß auch Sleeswijk eine Komplementverarmung beim aktiv anaphylaktischen Tier beobachtet hat, jedoch nicht schon im anaphylaktischen Stadium, sondern erst geraume Zeit später. Zugleich behauptet er, daß auch in dem während der Anaphylaxie entnommenen Serum sich die Komplementverarmung erst allmählich im Reagenzglas ausbilde. Allerdings hat Sleeswijk nur qualitative Komplementbestimmungen angestellt. Daß man bei einer genauen quantitativen Titration zu wesentlich anderen Resultaten kommt, zeigt der folgende Versuch.

#### V. Versuch.

7. VIII. Meerschweinchen No. 23, 500 g, No. 25, 500 g, werden mit 0,05 Hammelserum subkutan vorbehandelt.

20. VIII. Bei diesen Tieren Blutentnahme vor der Reinjektion und gleichzeitig bei einem Normaltier. Das Blut wird in 2 Röhrchen verteilt. Danach Reinjektion in die V. jugularis.

Tier No. 23.

11<sup>b</sup> 50 1,5 Hammelserum in V. jugularis.

11<sup>b</sup> 52 starke Anaphylaxie, Krämpfe und Sprünge.

11<sup>b</sup> 53 agonale Zuckungen. Blutentnahme in der Agone; das Blut wird auf 2 Röhrchen verteilt.

Tier No. 25, 500 g.

12<sup>b</sup> 14 Injektion von 1,0 Hammelserum in die V. jugularis.

12<sup>b</sup> 15 Tier taumelt, legt sich auf die Seite, Krämpfe.

12<sup>b</sup> 17 Blutentnahme in der Agone. Das Blut wird wiederum auf 2 Röhrchen verteilt.

Normaltier 300 g (Tier nicht vorbehandelt).

12<sup>b</sup> 39 Injektion von 1,0 Hammelserum in die Vena jugularis. Keine Symptome.

12<sup>b</sup> 43 Blutentnahme, das Blut wird auf 2 Röhrchen verteilt.

Die Blutproben werden zur Ausscheidung des Serums im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Es wurde nun mit derselben Ambozeptorverdünnung und mit derselben Blutkörperchenaufschwemmung das Serum des Normaltieres und der beiden anaphylaktischen Tiere zu verschiedenen Zeiten nach der Entnahme auf Komplementgehalt titriert. Das Resultat zeigt die folgende Tabelle V.

Tabelle V.

7. VIII. Meerschweinchen No. 23, 25 0,05 Hammelserum subkutan.

20. VIII. 1,0 resp. 1,5 Hammelserum intravenös; ebenso Kontrolle.  
Blutentnahme vor und nach der Reinjektion zur Komplementtitration.

Meerschweinchen No.	Gewicht in g	Dosis d. Reinjekt. (Hammelserum)	Blutentnahme und Alter des Serums bei der nachherigen Titration	Hämolyse mit Komplementmengen 1 ccm Volumen									
				0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,008	
23	500	1,5	vorher 2 Std. alt			+	+	+	+	+	+	±	
			„ 10 „ „				+	+	+	+	+	±	
			nachher 2 „ „		+	+	+	+	±	—	—	—	
			„ 10 „ „	+	+	+	+	+	±	—	—	—	
25	500	1,0	vorher 2 „ „			+	+	+	+	+	±	—	
			„ 10 „ „				+	+	+	±	—	—	
			nachher 2 „ „		+	+	±	—	—	—	—	—	
			„ 10 „ „		+	+	±	—	—	—	—	—	
Kontrolle	300	1,0	vorher 2 „ „			+	+	+	+	+	±	—	
			„ 10 „ „				+	+	+	+	—	—	
			nachher 2 „ „		+	+	+	+	+	±	—	—	
			„ 10 „ „	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Aus dieser Tabelle ergibt sich, daß bei quantitativer Komplementtitration im Gegensatz zu der Beobachtung von Sleswijk im Laufe einer gewissen Zeit keine weitere Komplementabnahme in vitro statthat.

#### Versuche an passiv anaphylaktischen Meerschweinchen.

Bei den Versuchen über passive Anaphylaxie hielten wir uns an die von Doerr und Russ in ihren sorgfältigen Versuchen als optimal erkannte Technik, d. h. wir injizierten das präzipitierende Serum intraperitoneal in der Dosis von 1 ccm 24 Stunden vor der intravenös erfolgenden Injektion des entsprechenden die Anaphylaxie auslösenden Serums.

Im nachstehenden bringen wir zunächst eine Uebersicht über die Vorbehandlung der Tiere, deren Sera für die Präparierung zur passiven Anaphylaxie dienten.

Kan. No. 64 und 66, je 2000 g.

11. VII. } 2,0 ccm Hammelserum iv.  
15. VII. }



19. VII. } 2,0 ccm Hammelserum ip.  
23. VII. }

1. VIII. Blutentnahme von 64.

3. VIII. No. 64 entblutet, No. 66 2,0 Hammelserum ip.

11. VIII. No. 66 entblutet.

Präzipitation mit Hammelserum	1:100	1:1000	1:10 000	1:100 000
No. 64 vom 1. u. 3. VIII.	++	++	+	—
No. 66 vom 11. VIII.	++	++	++	—

bei Zimmertemperatur in ca. 10 Minuten.

Kan. No. 2 und 3.

2. VIII. } 1,0 ccm Hühnerserum iv.  
6. VIII. }

9. VIII. 1,75 ccm Hühnerserum ip.

20. VIII. No. 2 und 3 entblutet.

Präzipitation mit Hühnerserum	1:100	1:1000	1:10 000
No. 2	++	++	—
No. 3	++	+	—

bei Zimmertemperatur in ca. 10 Minuten.

Als wir darangingen, bei den passiv präparierten Tieren das quantitative Verhalten des Komplements bei der Anaphylaxie zu untersuchen, machten wir eine höchst unerwartete Beobachtung, auf die wir zunächst mit einigen Worten eingehen müssen. Es zeigte sich nämlich bei allen Tieren einer Versuchsserie, als wir das vor und nach der Reinjektion entnommene Serum austitrierten, daß schon vor der Reinjektion 0,08 nicht mehr zur Komplettierung unseres hämolytischen Systems ausreichten. Bei zwei nicht präparierten Kontrolltieren dagegen zeigte das Serum den gewöhnlichen Komplementgehalt, der zwischen 0,04 und 0,01 schwankte. (Siehe Versuch VI.)

Das legte uns die Vermutung nahe, daß möglicherweise schon die Präparierung mit einem präzipitierendem Serum imstande wäre, allein eine Komplementverarmung des Meer-schweinchensersums zu verursachen. Zur Entscheidung dieser Frage stellten wir eine Versuchsreihe an, in der wir vor und 24 Stunden nach der Präparierung mit dem für Hammeleiweiß präzipitierenden Serum Kan. 66 den Komplementtiter bei den vorbehandelten Tieren bestimmten. Da die Tiere im Gewicht die der vorigen Serie etwa um das Dreifache übertrafen, wurde auch die dreifache Dose präzipitierenden Serums gegeben. Die Versuche sind in der nebenstehenden Tabelle VII zusammengestellt.

## VI. Versuch.

3. VIII. Meerschweinchen No. 111—116 je 1,0 Serum Kanin. 64 ip.

4. VIII. Hammelserum iv. in den in der Tabelle angegebenen Dosen.

Blutentnahme zur Komplementtitration vor und nach der Reinjektion.

Meerschweinchen No.	Gewicht in g	Dosis des intrap. injizierten präzipitier. Ser.	Dosis der Reinjektion nach 24 Std.	Blutentnahme	Hämolyse mit Komplementmenge in 1 ccm Vol.				
					0,08	0,06	0,04	0,02	0,01
111	190	1,0	0,4	vor der Reinjektion 3 1/2' nach der Reinj. 6' nach der Reinjekt.	—	—	—	—	—
112	210	1,0	0,3	vor der Reinjektion 1 1/2' nach der Reinj. 2 1/2' nach der Reinj. 4—6' nach der Reinj.	±	—	—	—	—
113	200	1,0	0,3	vor der Reinjektion 4' nach der Reinjekt.	—	—	—	—	—
114	210	1,0	0,4	vor der Reinjektion 1' nach der Reinjekt. 3 1/2' nach der Reinj.	±	—	—	—	—
115	195	1,0	0,4	5' nach der Reinjekt.	±	—	—	—	—
116	210	1,0	0,4	vor der Reinjektion 1 1/2—2 1/2' n. d. Reinj.	—	—	—	—	—
Kontrolle	210	—	0,4	vor der Reinjektion 1 1/2' nach der Reinj. 5—8' nach der Reinj.	+	+	±	±	±
Kontrolle	190	—	0,4	vor der Reinjektion 1' nach der Reinjekt.	+	+	+	+	±

## VII. Versuch.

15. VIII. Meerschw. No. 65—68 je 3,0 Ser. Kan. 66 intraperitoneal.

16. VIII. Blutentnahme zur Komplementtitration.

Meerschw. No.	Gewicht in g	Dosis der intraperiton. Injektion des präzipitierenden Serums	Blutentnahme	Hämolyse mit Komplementmenge in 1 ccm Volumen							
				0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01
65	460	3,0	vor d. 1. Injekt. nach 24 Std.	+	+	+	+	+	+	+	—
66	500	do.	vor d. 1. Injekt. nach 24 Std.	+	+	+	+	+	+	+	—
67	370	do.	vor d. 1. Injekt. nach 24 Std.			—	—	+	+	—	—
68	470	do.	vor d. 1. Injekt. nach 24 Std.	+	+	+	—	+	+	±	—

Die Tabelle zeigt in der Tat, daß allein schon die Präparierung in allen Fällen eine deutliche, in einigen Fällen sogar (No. 67 und 68) eine beträchtliche Verminderung des Komplementgehalts der Sera bewirkte, der auch bei diesen großen Tieren im Normalzustande sich etwa in den gleichen Grenzen bewegt wie bei den kleineren Tieren von 150 bis 200 g.

Ueber den zeitlichen Verlauf dieser Komplementabnahme unter dem Einfluß der Präparierung mit präzipitierendem Serum gibt Versuch VIII Aufschluß.

#### VIII. Versuch.

18. VIII. Meersch. No. 75, 81 je 1,5 Ser. Kan. 66 intraperitoneal.  
Blutentnahme nach verschiedenen Zeiten zur Komplementtitration.

Meersch. No.	Gewicht in g	Dosis des intraperiton. injizierten Serums	Blut-entnahme	Hämolysen mit Komplementmenge in 1 ccm Volumen										
				0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,008	0,006	0,004
75	300	1,5	vorher nach 3 Std. " 6 "	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
81	320	1,5	vorher nach 3 Std. " 18 "		+	+	+	+	+	+	±	—	—	—

Die Tabelle zeigt, daß bereits nach 3 Stunden die Komplementverarmung deutlich nachweisbar ist, in einem Falle nimmt sie dann in weiteren 3 Stunden noch zu, im anderen Falle bleibt der Titer noch nach 18 Stunden auf dem nach 3 Stunden erreichten Stand. Diese Komplementverarmung fehlte jedoch in einigen Fällen bei den präparierten Tieren und sie war andererseits sogar einigemale, wenn auch in geringem Grade, bei Vorbehandlung mit normalem Kaninchenserum vorhanden, wie der nachfolgende, gleichzeitig mit den beiden vorigen angestellte Kontrollversuch zeigt (s. Versuch IX).

Diese komplementverarmende Fähigkeit scheint aber, wie bemerkt, das normale Kaninchenserum nur selten zu besitzen

## IX. Versuch.

18. VIII. Meersch. No. 76 1,5 Ser. Normal-Kan. intraperitoneal.  
Blutentnahme nach verschiedenen Zeiten zur Komplementtitration.

Meersch. No.	Gewicht in g	Dosis des intraperton. injizierten Serums	Blut- entnahme	Hämolyse mit Komplementmenge in 1 cem Volumen											
				0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,008	0,006	0,004	
76340	1,5	vorher													
		nach 3 Std.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	
		„ 6 „	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—	
		„ 21 „	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	

und sie fehlt auch in der Regel bei Vorbehandlung mit anderen Normalseris. Auch durch die Injektion von Bouillon und Aleuronat ist eine Komplementverarmung in den von uns daraufhin untersuchten Fällen nicht ersichtlich, wenigstens hat das Serum nach 24 Stunden (vorher wurde leider nicht entnommen) den gewöhnlichen hohen Titerstand.

## X. Versuch.

8. VIII. Meerschweinchen erhalten je 1,0 Kaninchen- bzw. Hammelnormalserum bzw. Aleuronat und Bouillon intraperitoneal.

9. VIII. Blutentnahme zur Komplementtitration.

Meersch. No.	Gewicht in g	Intraperitoneale Injektion mit	Blutentnahme	Hämolyse mit Komplementmenge in 1 ccm Volumen									
				0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,008	0,006
32	140	1,0 N-Kan.-Ser.	n. 24 Std.	+	+	+	+	+	+	±	—		
26	160	dgl.	dgl.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
37	130	1,0 N-Hammel-serum	dgl.	+	+	+	+	+	+	+	+	0	
35	150	1,0 Bouillon	dgl.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
36	140	1,0 Aleuronat	dgl.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0

Auf das Wesen der Komplementverarmung durch die intraperitoneale Injektion von präzipitierendem Kaninchenserum und in geringerem Grade vielleicht auch durch Normalserum hier näher einzugehen, lag außerhalb des Rahmens unserer Arbeit. Wir behalten uns vor, später darauf zurückzukommen.

Für uns war es vielmehr von Interesse, zu konstatieren, wie sich nunmehr das Komplement weiterhin nach erfolgter Reinjektion im anaphylaktischen Stadium verhalte.

Schon durch die obigen Vorversuche konnten wir feststellen, daß weder mit Normal-Kaninchen- noch mit Normal-Hammelserum präparierte Tiere i. R. einen wesentlichen Komplementschwund zeigten. Dieser Komplementschwund trat auch dann nicht ein, wenn diese Tiere nachher intravenös mit 0,4 Hammelserum gespritzt wurden.

Dagegen zeigten die mit präzipitierendem Kaninchenserum vorbehandelten Tiere nach der Anaphylaktisierung einen so kolossalen Komplementschwund, daß kurze Zeit nach der Reinjektion der Komplementgehalt des Serums so gut wie völlig geschwunden war<sup>1)</sup>.

#### XI. Versuch.

8. VIII. Meerschweinchen intraperitoneal geimpft mit je 1 ccm Normal-Kaninchenserum, Normal-Hammelserum, präzipit. Kaninchenserum.

9. VIII. Reinjektion bei einem Teil der Tiere mit 0,4 Hammelserum.

Blutentnahme zur Komplementtitration teils vor, teils nach der Reinjektion.

Meerschw. No.	Gewicht	Dosis des intraperit. injizierten präzip. resp. Normalser.	Dosis d. Reinjekt. nach 24 Std. (Hammelserum)	Blutentnahme	Hämolyse mit Komplementmengen in 1 ccm Volumen							
					0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	
32	140	1 ccm Norm.-Kan.-Serum	—	24 <sup>b</sup> nach der Injektion	+	+	+	+	+	±	0	keinerlei Symptome dgl.
26	160	dgl.	—	dgl.	+	+	+	+	+	+	+	
30	140	dgl.	0,4	3' nach der Reinjektion	+	+	+	+	+	±	0	
31	150	dgl.	0,4	1' nach der Reinjektion	+	+	+	+	+	+	±	typische Anaphylaxie dgl.
28	140	1 ccm präzip. Serum	—	24 <sup>b</sup> nach der Injektion	+	+	+	+	+	+	0	
34	150	dgl.	0,4	2 <sup>1/2</sup> ' nach der Reinjektion	+	0	0	0	0	0	0	
29	140	dgl.	0,3	1 <sup>1/4</sup> ' nach der Reinjektion	+	0	0	0	0	0	0	keinerlei Symptome
37	130	1 ccm Hammel-Ser.	—	24 <sup>b</sup> nach der Injektion	+	+	+	+	+	+	0	
38	150	dgl.	0,4	2' nach der Reinjektion	+	+	+	+	+	+	+	

1) Es sei hier an ältere Versuche von Pfeiffer und Moreschi (Berl. klin. Wochenschr., 1906, p. 33) erinnert, die einen Komplementschwund in der Bauchhöhle des Meerschweinchens nachweisen konnten, wenn sie da mit Menschenambozeptor beladene Choleravibrionen und Serum eines mit Menscheneiweiß gespritzten Kaninchens zusammenbrachten.

Ganz besonders eklatant tritt dieser Komplementschwund auch im folgenden Versuche zutage, in dem ausnahmsweise (wir haben das übrigens sonst nur noch einmal beobachtet) durch die Präparierung mit präzipitierendem Serum keine nennenswerte primäre Komplementverminderung eingetreten zu sein scheint.

## XII. Versuch.

12. VIII. Meerschweinchen No. 44, 280 g, erhält 1,0 präzipitierendes Serum, Kaninchen No. 66 intraperitoneal.
13. VIII. 11<sup>b</sup> 2 Injektion von 0,5 Hammelserum in Vena jugularis.  
 11<sup>b</sup> 5 beginnende Anaphylaxie.  
 11<sup>b</sup> 7 schwere Anaphylaxie.  
 11<sup>b</sup> 8 Reflexe erloschen.  
 11<sup>b</sup> 9 Blutentnahme in vivo.

Titration des Komplementes mit Kaninchen-Hammelumbozeptor  $\frac{1}{20}$  (50 IE.).

	Komplementmenge in 1 ccm Volumen						
	0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02
Vor der Injektion des Hammelserums	+	+	+	+	+	+	+
Nach der Injektion des Hammelserums	—	—	—	—	—	—	—

Noch schöner aber ist das Resultat der folgenden Versuchsreihe, in der wir unter Verwendung großer Tiere in der Lage waren, sowohl vor der ersten Injektion, wie vor der anaphylaktisierenden Injektion und zu verschiedenen Zeiten nach dieser genügende Mengen von Blut zu entnehmen (siehe Tabelle XIII. Versuch auf p. 610).

Die Tabelle bedarf bei ihrer völligen Klarheit keines weiteren Kommentars, sie zeigt wiederum in Uebereinstimmung mit den früheren Befunden eine partielle Verarmung des Serums an Komplement durch die Präparierung einen völligen Schwund hingegen im Anschluß an die die Anaphylaxie auslösende Injektion. Der in dieser Tabelle enthaltene Kontrollversuch No. 70 liefert hier noch das interessante Ergebnis, daß bei einem nichtpräparierten Tiere sogar eine geringe Komplementvermehrung im Anschluß an die Seruminjektion zu konstatieren ist. Das ist vielleicht auf den Komplementgehalt des

## XIII. Versuch.

15. VIII. Meerschweinchen; Blutentnahme aus Ohrvene, danach erhielten die Tiere je 1,0 präzipit. Serum Kaninchen 66 intraperitoneal.

16. VIII. Reinjektion intravenös mit Hammelserum.

Blutentnahme vor und nach der Reinjektion zur Komplementtitration.

Meerschweinchen No.	Gewicht	Dosis des intrap. injiz. präzipit. Ser. Kan. 66	Blutentnahme	Dosisd. Reinjekt. nach 24 Std. (Hammelserum)	Hämolyse mit Komplementmengen in 1 cem Volum								
					0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,008
65	460	3,0	vor der I. Injektion vor der Reinjektion 9—12' n. d. Reinj. 24' nach d. Reinj.	1,5	+	+	+	+	+	+	+	0	0
66	500	3,0	vor der I. Injektion vor der Reinjektion 10' nach d. Reinj. 21' nach d. Reinj.	2,0	0	+	+	+	+	+	+	0	0
67	370	3,0	vor der I. Injektion vor der Reinjektion 4' nach der Reinj.	1,5			0	0	+	+	0	0	0
68	470	3,0	vor der I. Injektion vor der Reinjektion 7½—9' n. d. Reinj.	1,5	+	+	+	0	+	+	±	0	0
70 Kontrolle	430	—	entsprechend d. Zeit der I. Injektion vor d. Injektion des sonst zu Reinjekt. dienenden Serums 5' nach der Injekt. 10' nach der Injekt.	2,0					+	+	+	0	0
							+	+	+	+	+	±	±

zur Auslösung der Anaphylaxie dienenden Hammelserums selbst zurückzuführen.

Dadurch erscheint die kolossale Komplementverarmung bei der passiven Anaphylaxie noch in verstärktem Lichte. Auch hier dünkt es uns überflüssig, bei der vollen Eindeutigkeit der Versuche weitere ausführliche Versuchsprotokolle zu geben. Einige weitere hierher gehörige Versuche sind übrigens in Tabelle XXII enthalten.

Ueberblicken wir das Resultat der in den Tabellen I—XII niedergelegten Versuche, so muß die Konstanz der Komplementverarmung unsere Aufmerksamkeit erwecken.

Wenn wir auch bei der aktiven wie bei der passiven Anaphylaxie die Komplementverarmung in gleicher Weise eintreten sehen, so besteht doch ein ganz kolossaler quantitativer Unterschied. In jedem Falle geht bei der passiven Anaphylaxie, auch wenn wir von der primären Komplementverarmung durch die Präparierung absehen, die Abnahme fast bis zum völligen Schwund, während bei der aktiven Ueberempfindlichkeit, zwar auch eine konstante, aber doch eine weit geringere Komplementverarmung statthat. Die aktiven Tiere haben immer, selbst in der Agone, häufig ein komplementreicheres Serum als die passiven Tiere 24 Stunden nach der Präparierung. Für diese Tatsache des stärkeren Komplementverlustes bei den passiven Tieren durch die 2. Injektion ist aber nicht der primäre Schwund durch die Präparierung an sich verantwortlich zu machen, sondern wir sehen auch in den Fällen, in denen die durch die Präparierung bedingte primäre Komplementverarmung nicht deutlich ausgesprochen war, den Komplementtiter durch die 2. Injektion fast auf 0 sinken.

Die Konstanz dieses Befundes läßt vermuten, daß die Komplementverarmung mit der Anaphylaxie in einem gewissen ursächlichen Zusammenhang steht, daß möglicherweise die Komplementverarmung von ausschlaggebender Bedeutung ist für das Zustandekommen der Ueberempfindlichkeit. A priori war das nicht unbedingt erforderlich; man konnte annehmen, daß es sich bei der Komplementverarmung nur um eine rein sekundäre Begleiterscheinung handelt, die mit der Anaphylaxie als solcher gar nichts zu tun hat und uns daher auch nicht weiter über das noch gänzlich dunkle Wesen der Anaphylaxie aufzuklären imstande ist. Wenn wir zunächst aber die erste Möglichkeit diskutieren, so liegt besonders für die passive Anaphylaxie doch der Gedanke sehr nahe, daß die akute, vollständige Komplementverarmung selbst es wäre, welche als Ursache des Anaphylaxiesymptomenkomplexes anzusehen sein könnte. Berücksichtigen wir dabei aber, wie relativ gering der Komplementschwund bei der aktiven Anaphylaxie ist, so ist diese Hypothese weniger wahrscheinlich, zumal wenn wir bedenken, daß bezüglich der Stärke der Symptome und des zeitlichen



Verlaufes die aktive Anaphylaxie sich von der passiven in nichts unterscheidet. Immerhin könnte man auch dann noch daran denken, daß bereits eine geringe, plötzlich einsetzende Komplementverarmung genügen könnte, um die Krankheitssymptome auszulösen. Wenn dem so wäre, so müßte die Anaphylaxie durch Zufuhr neuen Komplementes unmittelbar vor oder nach der Reinjektion gerade beim aktiv anaphylaktischen Tier sich leicht verhüten lassen.

Zur Entscheidung dieser Frage wurde der folgende Versuch angestellt.

#### XIV. Versuch.

Meerschweinchen No. 57, 200 g, am 13. VIII. mit 0,01 Rinderserum subkutan vorbehandelt.

25. VIII. 1<sup>b</sup> 49—50 Injektion von 2 ccm frischem normalen Meerschweinchenserum in die rechte Vena jugularis.

1<sup>b</sup> 51 Injektion von 0,04 Rinderserum in die linke Vena jugularis.

1<sup>b</sup> 53 Tier unruhig, schnuppert, anaphylaktische Sprünge, schwere Anaphylaxie.

1<sup>b</sup> 54 $\frac{1}{2}$  Reflexe erloschen.

1<sup>b</sup> 56 Tod.

Meerschweinchen No. 64, 200 g. Vorbehandlung wie voriges.

26. VIII. 3<sup>b</sup> 31 $\frac{1}{2}$  Reinjektion von 0,2 Rinderserum in die linke Jugularis.

3<sup>b</sup> 33—34 Injektion von 2,0 frischem normalen Meerschweinchenserum in die rechte Jugularis.

3<sup>b</sup> 35 Tier matt, legt sich auf die Seite, zappelt, typische Krämpfe.

3<sup>b</sup> 36 Tod.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß weder die unmittelbar vor, noch die unmittelbar nach der Reinjektion erfolgende Zufuhr neuen Komplementes imstande ist, die Anaphylaxie zu verhüten. Es dürfte demnach nicht die Komplementverarmung an sich als Ursache für die Anaphylaxie anzusehen sein. Gleichwohl könnte der Komplementschwund in einem kausalen Zusammenhang mit der Anaphylaxie stehen.

Wir wissen, daß bei der Eiweiß-Antieiweißreaktion in vitro Komplement, sofern es vorhanden ist, verankert wird. Gemäß unserer Theorie der Anaphylaxie haben wir bei der Eiweiß-Antieiweißreaktion im Organismus, wie sie bei der Reinjektion eintritt, gleichfalls eine Verankerung des hier ja reichlich vorhandenen Komplementes durch die sich bildenden Eiweiß-Antieiweißverbindungen zu erwarten. Somit wäre die von uns konstant beobachtete Komplementverarmung im

zirkulierenden Blut als Verankerung des Komplementes an die sich bei der Anaphylaxie bildenden Eiweiß-Antieißverbindungen anzusehen, wobei das verankerte Komplement vielleicht seinerseits erst den Vergiftungsprozeß auslöst. Das ist eine Ansicht, zu der auch Friedemann bei seinen Versuchen über Blutkörperchenanaphylaxie auf Grund entsprechender Versuche gelangt ist und er hat bereits ähnliche Verhältnisse auch für die Eiweißanaphylaxie vermutet.

Wenn nun also die Komplementverankerung mit der Anaphylaxie in engstem Zusammenhang stehen soll, so müßten Mittel, die geeignet sind, die Komplementverankerung im Organismus zu verhüten, auch die anaphylaktischen Symptome hintanhaltend. Derartige Mittel kennen wir bisher nicht. Wir wissen aber, daß es *in vitro* leicht gelingt, die Komplementbindung zu verhindern, z. B. durch den von Ehrlich und Morgenroth<sup>1)</sup> angegebenen Kältetrennungsversuch, dann durch Bariumchlorid nach v. Dungern und Coca<sup>2)</sup>, besonders aber durch hypertonsche Salzlösungen, wie das Nolf<sup>3)</sup>, Markel<sup>4)</sup>, Ehrlich und Sachs<sup>5)</sup>, vor allem aber Hektoen und Ruediger<sup>6)</sup>, Manwaring<sup>7)</sup> gezeigt haben. Aus diesen Untersuchungen wissen wir, daß schon eine geringe Steigerung des Salzgehaltes über die Isotonie hinaus genügt, um die Komplementverankerung zu verzögern oder ganz zu verhüten, während, wie Angerer<sup>8)</sup> in jüngster Zeit unter der Leitung

1) Ehrlich und Morgenroth, Ueber Hämolyse. Berl. klin. Wochenschr., 1900.

2) Dungern und Coca, Ueber spezifische Hämolyse durch isotonische Salzlösungen. Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 1.

3) Nolf, Annales Inst. Past., 1900.

4) Markel, Die Erhaltung der Hämolyse durch Salze. Zeitschr. f. Hyg., 1902, Bd. 39.

5) Ehrlich und Sachs, Ueber den Mechanismus der Ambozeptorwirkung. Berl. klin. Wochenschr., 1902, No. 21.

6) Hektoen und Ruediger, The antilytic action of salt solutions and other substances. Journ. of Infect. Diseases., 1904, Vol. 1.

7) Manwaring, The action of certain salts on the complement in immune serum. Ibid.

8) Angerer, Ueber den Einfluß hypertonscher Salzlösungen auf die Verankerung des Ambozeptors. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. (im Erscheinen).

des einen von uns gezeigt hat, die Ambozeptorbindung selbst in konzentrierter Kochsalzlösung in der gewöhnlichen Weise statthat.

Es lag nahe, durch Injektion von konzentrierter Salzlösung auch im Organismus eine ähnliche Hypertonie wie im Reagenzglasversuch zu schaffen, um damit eventuell die Komplementverankerung in vivo zu verhindern. Wenn das gelänge und damit zugleich die anaphylaktischen Symptome ausblieben, so wäre damit gewissermaßen der Beweis geliefert, daß tatsächlich die Komplementverarmung in ursächlichem Zusammenhang steht mit der Anaphylaxie.

Wir wissen freilich, daß der Organismus mit außerordentlicher Energie bestrebt ist, die Isotonie seines Blutes zu wahren und auch nicht beliebig große Salzmengen verträgt. Nach den Untersuchungen von Guttman<sup>1)</sup> und Herrmans<sup>2)</sup> u. a. wirken Dosen von über 2 g NaCl bei intravenöser Injektion pro Kilo Tier krankmachend resp. tödend. Unter der Annahme, daß wir einem Meerschweinchen von 200 g dementsprechend 0,4 g Kochsalz injizieren können, würden bei der Serummenge von 8 ccm gleich  $\frac{1}{25}$  des Körpergewichts wenigstens für kurze Zeit eine  $5\frac{1}{2}$ -fache Isotonie des Serums resultieren. Da schon in  $1\frac{1}{2}$ - bis 2-proz. Kochsalzlösung in vitro die Komplementverankerung so gut wie vollständig aufgehoben ist und die Bindungsverhältnisse in einem entsprechend hypertonen Serum sich wohl noch ungünstiger gestalten, so beständen im Organismus selbst dann günstige Bedingungen für die Verhütung der Komplementverankerung für einige Zeit, wenn auch eine relativ schnelle Rückkehr zur Isotonie eintritt.

Der Uebertragung dieser Versuche vom Reagenzglas auf den Tierkörper standen aber gerade bei anaphylaktischen Tieren Bedenken gegenüber durch Versuche, die von Heilner<sup>3)</sup> sowie Davidsohn und Friedemann<sup>4)</sup> veröffentlicht worden sind. Heilner behauptet, daß mit Eiweiß vorbehandelte Tiere zur Zeit, in der sie gegenüber dem betreffenden Eiweißkörper überempfindlich sind, auch eine erhöhte Empfind-

1) Guttman, Berl. klin. Wochenschr., 1865, No. 36.

2) Herrmans, Tox. Studien über Kalium- und Natriumchlorid. Inaug.-Diss. Marburg, 1872.

3) Heilner, Zeitschr. f. Biol., 1908.

4) Davidsohn und Friedemann, Berl. klin. Wochenschr., 1909.

lichkeit gegenüber Injektionen von Kochsalz im Vergleich zu Kontrolltieren zeigen. Frey<sup>1)</sup> hat allerdings die Befunde von Heilner nicht bestätigen können. Doch beobachteten Davidsohn und Friedemann in einer gewissen Uebereinstimmung mit Heilner, daß auch die Fieber erzeugende Wirkung des Salzes bei mit Eiweiß präparierten Tieren deutlicher in Erscheinung tritt als bei Kontrollen. Derartige Befunde, die auf eine erhöhte Empfindlichkeit anaphylaktisch gemachter Tiere gegenüber dem Salz hinwiesen, veranlaßten uns, anfangs mit der Dosierung des Salzes sehr vorsichtig zu sein. Wir benutzten für unsere Versuche zur intravenösen Injektion gesättigte Kochsalzlösung, bei der Volumina von unter 1 ccm in der Regel auf 1 ccm mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt wurden. Und in der Tat haben wir einige Male dabei bereits den Tod der Tiere mit Salzmengen beobachtet, die nicht mehr als etwa die Hälfte der von Guttman, Herrmans usw. ermittelten Maximaldosen betrugten.

Erst als wir dazu übergingen, diese gesättigten Salzlösungen anstatt in einem kurzen Zeitintervall ganz allmählich einzuspritzen, so daß die Injektion von 1 ccm Salzlösung in die Jugularis etwa 1½ bis 2 Minuten dauerte, konnten wir bei den anaphylaktischen Tieren die Maximaldosen nach Guttman und Herrmans unbedenklich anwenden.

In einigen Fällen haben wir der gesättigten Kochsalzlösung, um ihre Giftigkeit zu verringern, noch 1 Proz. CaCl<sub>2</sub> zugesetzt. Da wir jedoch mit dieser Salzmischung (in den nachstehenden Protokollen kurz als „Mischung“ bezeichnet) keine anderen Resultate als mit der einfachen Kochsalzlösung erzielten, so sind die Erfolge nicht etwa auf den geringen Zusatz von CaCl<sub>2</sub> zu beziehen. Wir möchten darauf ausdrücklich hinweisen, weil Netter<sup>2)</sup> eine gewisse Beeinflussung der Serumkrankheit des Menschen durch CaCl<sub>2</sub> gesehen haben will und weil nach den Untersuchungen von Biedl und Kraus<sup>3)</sup> das verwandte BaCl<sub>2</sub> vermöge seiner von Boehm<sup>4)</sup> entdeckten gefäßver-

1) Frey, Studien über Serumüberempfindlichkeit, insbesondere das Theobald Smithsche Phänomen. Arb. a. d. Inst. f. Infektionskrankh. Bern, 1908, Heft 1.

2) Netter, Compt. rend. Soc. de Biol., 1906.

3) Biedl und Kraus, Wien. klin. Wochenschr., 1909.

4) Boehm, Ueber die Wirkungen der Barytsalze auf den Tierkörper. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 3, 1875.

engernden Wirkung von einem gewissen Einfluß auf die Anaphylaxiekurve beim Hund zu sein scheint.

In unseren Versuchen, in denen wir bestrebt waren, durch Einspritzung von Salzlösung vor der Reinjektion den Ausbruch der anaphylaktischen Symptome zu verhüten, gingen wir nun im einzelnen folgendermaßen vor. Wir spritzten am fixierten Tier unter Anwendung der oben beschriebenen Technik in die linke Jugularvene die Salzlösung ein und etwa 1 bis 2 Minuten später das Serum in die andere Jugularis. Dann wurde das Tier sofort abgespannt und es wurde auf den Ausbruch der anaphylaktischen Symptome geachtet. Natürlich wurde eine entsprechende Reihe von Kontrollversuchen angesetzt, in denen die Salzinjektion vor der Reinjektion unterblieb.

Wir bringen im nachstehenden eine Reihe von Versuchen mit kurzer Schilderung des Symptomkomplexes, die uns ein Urteil geben sollen über den Einfluß der Salzinjektion.

#### A. Versuche mit kleineren Salzdosen.

##### I. Versuche an aktiv anaphylaktischen Tieren.

###### XV. Versuch.

29. VII. Meerschweinchen No. 73—82 mit je 0,01 Rinderserum subkutan vorbehandelt.
12. VIII. No. 77, 200 g. 0,3 gesättigte NaCl-Lösung iv., sofort danach 0,2 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.; tot ohne anaphylaktische Symptome nach 5 Minuten.
12. VIII. No. 76, 200 g. Wie voriges, nur 0,1 Rinderserum iv., typische Anaphylaxie; tot nach 9 Minuten.
12. VIII. No. 80, 200 g. 0,3 gesättigte NaCl-Lösung mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1,0 aufgefüllt iv. Sofort matt, erholt sich nach 4 Min., nach 5 Min. Injektion von 0,1 Rinderserum in 0,5 Vol. iv., nach 8 Min. vereinzelte anaphylaktische Sprünge, nach 11 Min. kurz-dauernder Singultus, nach 17 Min. matt, normale Atmung, erst nach 2 Std. tot.
12. VIII. No. 82, 200 g. .
  - 4<sup>h</sup> 48 0,3 gesättigtes NaCl-Lösung mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1,0 ccm aufgefüllt iv.
  - 5<sup>h</sup> 03 Injektion von 0,1 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.
  - 5<sup>h</sup> 06 typische Anaphylaxie.
  - 5<sup>h</sup> 12 anaphylaktischer Tod.
12. VIII. No. 79, 200 g.
  - 5<sup>h</sup> 38 0,3 gesättigte NaCl-Lösung mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1 ccm aufgefüllt iv.

5<sup>h</sup> 41 Injektion von 0,1 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

5<sup>h</sup> 45 schweres Atmen, Singultus.

5<sup>h</sup> 50 liegt ruhig auf der Seite, erholt sich. nach 24 Std. munter.

#### XVI. Versuch.

Bei zwei Meerschweinchen aus der Serie No. 93—102, welche am 2. VIII. mit 0,01 Rinderserum subkutan vorbehandelt waren, wurden gleichfalls kleinere Salzdosen injiziert.

17. VIII. No. 102, 180 g.

3<sup>h</sup> 43 0,4 Mischung mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1 ccm aufgefüllt iv.

3<sup>h</sup> 47 0,25 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

3<sup>h</sup> 49 typische Anaphylaxie.

3<sup>h</sup> 53 tot.

17. VIII. No. 99, 200 g.

5<sup>h</sup> 00 0,5 Mischung mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1,0 ccm aufgefüllt iv.

5<sup>h</sup> 06 0,25 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

5<sup>h</sup> 09 typische Anaphylaxie.

5<sup>h</sup> 13 tot.

Wir sehen also, daß in einer Serie von 5 aktiv anaphylaktischen Tieren schon eine Dosis von 0,3 gesättigter NaCl-Lösung genügte, um in 2 Fällen die Anaphylaxie deutlich zu beeinflussen. Bei Tier No. 80 war die Anaphylaxie sehr leicht ausgesprochen, so daß das Tier im Gegensatz zu den anderen dieser Serie nur geringe Symptome der Anaphylaxie zeigte und 2 Stunden am Leben blieb, während Tier No. 79 überhaupt keine typischen Anaphylaxiesymptome darbot und nach 24 Stunden noch lebte.

Wenn wir auch entgegen der Angabe von Doerr und Russ, wonach 7 Proz. der Meerschweinchen refraktär sein sollen, bei unseren zahlreichen Versuchen ohne Salz in keinem einzigen Fall bei entsprechenden Dosen des Reinjektionsserums die Anaphylaxie ausbleiben sahen, so ist den günstig verlaufenen Salzversuchen dennoch keine allzugroße Beweiskraft beizulegen in Anbetracht der relativ zahlreichen Versuche dieser Serien, in denen trotz der Salzinjektion ein Einfluß auf die Anaphylaxie nicht zutage trat.

## II. Versuche an passiv anaphylaktischen Tieren.

#### XVII. Versuch.

3. VIII. Meerschweinchen No. 117—119 erhalten je 1,0 ccm Kaninchenserum No. 64 ip.

4. VIII. No. 118, 150 g. Kontrolle. 0,4 Hammelserum iv., Anaphylaxie, Exitus nach 5 Min.
4. VIII. No. 119, 160 g. Kontrolle. 0,4 Hammelserum iv., Anaphylaxie, Exitus nach 5 Min.
4. VIII. No. 117, 160 g. 0,4 gesättigte NaCl-Lösung, mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1,5 ccm aufgefüllt, in die Vena femoralis, 0,5 Hammelserum sofort nachgespritzt in Vena jugularis, bleibt munter, nach 15 Min. leichte Symptome, nochmals 0,2 gesättigte NaCl-Lösung ip.; Tier erholt sich, bleibt am Leben.

## XVIII. Versuch.

6. VIII. Meerschweinchen No. 3—12 erhalten je 1,0 ccm Kaninchenserum No. 64 ip.
7. VIII. No. 5, 150 g. Kontrolle. 0,4 Hammelserum iv., typische Anaphylaxie, Exitus nach 5 Min.
7. VIII. No. 8, 145 g. Kontrolle. 0,4 Hammelserum iv., typische Anaphylaxie, Exitus nach 5 Min.
7. VIII. Kontroll-Meerschweinchen I, 160 g. 0,5 gesättigte NaCl-Lösung iv., Exitus.
7. VIII. Kontroll-Meerschweinchen II, 150 g. 0,3 gesättigte NaCl-Lösung iv., bleibt am Leben.
7. VIII. No. 3, 145; No. 4, 150 g. Injektion von je 0,5 gesättigter NaCl-Lösung gemischt mit 0,4 Hammelserum iv., typische Anaphylaxie, Exitus nach 5 Min.
7. VIII. No. 10, 180 g; No. 12, 150 g. Je 0,3 gesättigte NaCl-Lösung iv., gleich darauf 0,4 Hammelserum iv., Anaphylaxie, Exitus nach 5 Min.
7. VIII. No. 9, 145 g. 2,0 gesättigte NaCl-Lösung subkutan, nach 10 Min. 0,3 gesättigte NaCl-Lösung iv., nach einer weiteren Minute 0,4 Hammelserum iv.; leichte aber deutliche Anaphylaxie, Exitus nach 10 Min.
7. VIII. No. 11, 170 g. 0,3 gesättigte NaCl-Lösung iv., gleich darauf 0,4 Hammelserum iv.; keinerlei Symptome, bleibt am Leben.

## XIX. Versuch.

18. VIII. Meerschweinchen No. 77—80 erhalten je 1,0 ccm Kaninchenserum No. 66 intrap.
19. VIII. No. 79, 180 g. Kontrolle.
  - 8<sup>b</sup> 28 0,2 Serum aufgefüllt mit physiologischer NaCl-Lösung auf 0,5 iv.
  - 8<sup>b</sup> 29 starke Anaphylaxie.
  - 8<sup>b</sup> 31 vereinzelte Atemzüge, terminale Krämpfe, keine Reflexe.
  - 8<sup>b</sup> 32<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Exitus.
19. VIII. No. 80, 180 g.
  - 7<sup>b</sup> 54<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 0,3 gesättigte NaCl-Lösung mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1,0 aufgefüllt iv.
  - 7<sup>b</sup> 57 0,2 Hammelserum in 0,5 Vol. iv.
  - 7<sup>b</sup> 59 ein anaphylaktischer Sprung.
  - 8<sup>b</sup> 02 Tier atmet schwach aber ruhig.
  - 8<sup>b</sup> 10 ist vollständig ruhig, lebt; nach 24 Stunden munter.

Auch bei den passiv anaphylaktischen Tieren erzielten wir also bei Verwendung entsprechender Salzdosen in einigen Fällen ein Ausbleiben der Anaphylaxie. Doch auch in diesen Versuchen ist der Effekt keineswegs regelmäßig. Immerhin kommt den Versuchen eine gewisse Beweiskraft zu, weil auch hier wieder bei den Kontrollversuchen ebenso wie in den anderen entsprechenden nicht veröffentlichten Serien die Kontrolltiere, mit den gleichen Dosen Serum reinjiziert, ausnahmslos typische Anaphylaxie bekamen. Bei den Tieren des Versuches XVII zeigt sich bei den mit Kochsalz allein gespritzten Kontrollen schon eine Dosis von 0,5 gesättigter NaCl-Lösung bei der damals noch raschen Injektion als letal. Wir mußten uns deshalb auf 0,3 bis 0,4 gesättigte NaCl-Lösung beschränken, um einige Male positive Resultate zu erhalten.

Die Erfolge gestalteten sich ganz wesentlich anders, als wir nun daran gingen, die zeitliche Dauer der Salzinjektion bedeutend zu verlängern, und dadurch größere Salzdosen zu injizieren imstande waren. Wir kamen auf diesen Modus der Injektion, als wir zum erstenmale am Kymographion unter Aufzeichnung von Puls und Atmung die Injektion vornahmen, Versuche, auf die wir weiter unten noch ausführlich zu sprechen kommen. Da zeigte sich nämlich, daß bei schneller Salzinjektion eine außerordentlich starke, bedrohliche Blutdrucksenkung eintrat, die aber fast vollständig vermieden wurde, wenn die Injektion ganz allmählich erfolgte. Diese Art der Injektion haben wir dann ausschließlich angewandt und sind zu Resultaten gekommen, die in den beiden folgenden Versuchsreihen niedergelegt sind. Bei diesen Versuchen haben wir die weitere Vorsichtsmaßregel gebraucht, den Grad der Ueberempfindlichkeit bei den aktiven und passiven Tieren genau auszutitrieren, wie es uns Doerr und Russ für die passiven Tiere zum ersten Male gelehrt hatten. Wir haben dann von dem Reinjektionsserum nicht beliebige Mengen genommen, sondern nur Dosen, die kein allzugroßes Multiplum der Dosis letalis minima darstellten.

Die unter diesen Verhältnissen angestellten Versuche folgen mit den entsprechenden Kontrollen in den nachstehenden Protokollen.



**B. Versuche mit größeren Salzdosen.****I. Versuche an aktiv anaphylaktischen Tieren.****XX. Versuch.**

13. VIII. 20 Meerschweinchen mit 0,01 Rinderser. subkutan gespritzt.

25. VIII. Reinjektion mit frischem Rinderserum, die angegebenen Dosen beziehen sich auf 100 g Körpergewicht.

a) Vorversuch: Auswertung des anaphylaktischen Zustandes.

No. 62, 200 g.

5<sup>b</sup> 24 0,002 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

5<sup>b</sup> 26 Tier kratzt sich, schnuppert, sträubt das Fell.

5<sup>b</sup> 29 anaphylaktische Sprünge.

5<sup>b</sup> 30 andauernde klonische Krämpfe (bis zu 72 Zuckungen in der Minute gezählt).

5<sup>b</sup> 35 Tier wieder ruhig.

5<sup>b</sup> 43 Tier wieder munter, bleibt völlig munter.

6<sup>b</sup> 20 Tier wird entblutet.

No. 56, 230 g.

4<sup>b</sup> 52 0,005 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

4<sup>b</sup> 53<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Tier schnuppert, kratzt sich, unruhig.

4<sup>b</sup> 54 sehr starke Krämpfe, legt sich auf die Seite.

4<sup>b</sup> 55 Reflexe erloschen, vereinzelte tiefe Atemzüge.

4<sup>b</sup> 57 tot.

No. 52, 260 g.

11<sup>b</sup> 17<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, —8 0,005 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

11<sup>b</sup> 20 schüttelt den Kopf, sehr unruhig.

11<sup>b</sup> 11<sup>1</sup>/<sub>2</sub> schwere Krämpfe, typische Anaphylaxie, atmet schwer.

11<sup>b</sup> 13 asphyktische Atmung.

11<sup>b</sup> 14 Tier sitzt wieder aufrecht, scheint sich zu erholen.

12<sup>b</sup> 00 Tier ist erholt und bleibt munter.

12<sup>b</sup> 40 Tier wird entblutet.

No. 48, 280 g.

12<sup>b</sup> 09 0,01 Rinderserum im 0,5 Vol. iv.

12<sup>b</sup> 11 schnuppert, kratzt sich, sträubt das Fell, springt auf.

12<sup>b</sup> 12 Tier sehr unruhig, Krämpfe, legt sich auf die Seite, kolossal starke Krämpfe.

12<sup>b</sup> 13 vereinzelte Atemzüge.

12<sup>b</sup> 15 Atmung etwas frequenter.

12<sup>b</sup> 17 Tier setzt sich auf, erholt sich, wird vollständig munter.

12<sup>b</sup> 48 Blutentnahme.

Tier stirbt bald nach der reichlichen Blutentnahme.

No. 45, 270 g.

10<sup>b</sup> 53<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 0,01 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

10<sup>b</sup> 56 Tier ist unruhig, kratzt sich, springt, taumelt.

10<sup>b</sup> 57 fällt auf die Seite, schwere anaphylaktische Krämpfe, Abgang von Urin, vereinzelte Atemzüge.

10<sup>b</sup> 58 Reflexe erloschen.

10<sup>b</sup> 58 tot.

No. 46, 260 g.

4<sup>b</sup> 30 0,01 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

4<sup>b</sup> 32 typische anaphylaktische Sprünge und Krämpfe.

4<sup>b</sup> 33 Tier legt sich auf die Seite.

4<sup>b</sup> 34 Reflexe erloschen, vereinzelte agonale Atemzüge.

4<sup>b</sup> 35 tot.

No. 63, 190 g.

6<sup>b</sup> 36 $\frac{1}{2}$ , 0,01 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

6<sup>b</sup> 38 anaphylaktische Sprünge.

6<sup>b</sup> 39 legt sich auf die Seite.

6<sup>b</sup> 39 $\frac{1}{2}$ , agonale Krämpfe, Reflexe positiv.

6<sup>b</sup> 40 vereinzelte Atemzüge, Reflexe erloschen.

6<sup>b</sup> 42 tot.

No. 60, 250 g.

12<sup>b</sup> 56 $\frac{1}{2}$ , 0,02 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

12<sup>b</sup> 57 $\frac{1}{2}$ , schnuppert, schüttelt den Kopf, kratzt sich.

12<sup>b</sup> 58 anaphylaktische Sprünge.

12<sup>b</sup> 58 $\frac{1}{4}$ , wälzt sich, sehr starke Anaphylaxie.

12<sup>b</sup> 58 $\frac{1}{2}$ , terminale Krämpfe von tetanischem Typus.

12<sup>b</sup> 59 Reflexe erloschen.

12<sup>b</sup> 59 $\frac{1}{2}$ , tot.

No. 58, 250 g.

4<sup>b</sup> 12 0,02 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

4<sup>b</sup> 13 Tier kratzt sich.

4<sup>b</sup> 13 $\frac{1}{2}$ , anaphylaktische Sprünge, deutliche Anaphylaxie.

4<sup>b</sup> 14 $\frac{1}{2}$ , sehr starke Krämpfe.

4<sup>b</sup> 15 Tier wälzt sich, legt sich auf die Seite.

4<sup>b</sup> 15 $\frac{1}{4}$ , starke Zuckungen, vereinzelte Atemzüge, ganz livide Lippen.

4<sup>b</sup> 16 $\frac{1}{4}$ , Reflexe erloschen.

4<sup>b</sup> 17 tot. (Blutentnahme sofort post mortem.)

Die Auswertung des aktiv anaphylaktischen Zustandes ergibt also, daß 0,002 Rinderserum bei der Reinjektion noch sicher krankmachend und 0,01 in 3 von 4 Fällen tödlich gewirkt hat.

b) Versuche mit prophylaktischen Salzinjektionen.

No. 50, 260 g.

11<sup>b</sup> 31—32 1,0 ccm ges. NaCl-Lösung iv.

11<sup>b</sup> 34—34 $\frac{1}{2}$ , 0,01 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.

11<sup>b</sup> 39 erschwerte Atmung, sonst normal.

- 11<sup>b</sup> 47 schüttelt den Kopf.  
 11<sup>b</sup> 57 relativ wohl, lebt > als 12 Std.<sup>1)</sup>.
- No. 47, 220 g.  
 6<sup>b</sup> 16<sup>3</sup>/<sub>4</sub>—17<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 1,0 ccm Mischung iv.  
 6<sup>b</sup> 20 0,01 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.  
 6<sup>b</sup> 21<sup>1</sup>/<sub>2</sub> keinerlei Symptome.  
 6<sup>b</sup> 23 ebenso.  
 6<sup>b</sup> 24<sup>1</sup>/<sub>2</sub> ebenso.  
 6<sup>b</sup> 28<sup>1</sup>/<sub>2</sub> etwas matt, keinerlei Symptome, lebt > als 12 Std.
- No. 61, 180 g.  
 6<sup>b</sup> 59—60<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 1,0 ccm Mischung iv.  
 7<sup>b</sup> 02—02<sup>1</sup>/<sub>4</sub> 0,01 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.  
 7<sup>b</sup> 05 keinerlei Symptome.  
 7<sup>b</sup> 10 ebenso.  
 7<sup>b</sup> 15 ebenso; lebt > als 12 Std.
- No. 54, 260 g.  
 12<sup>b</sup> 35—36 1,0 ges. NaCl-Lösung iv.  
 12<sup>b</sup> 37 0,02 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.  
 12<sup>b</sup> 44 Tier ganz ruhig, etwas matt, sonst keine Symptome.  
 12<sup>b</sup> 45 Beginn deutlicher Anaphylaxie, Tier legt sich auf die Seite, zeigt aber keine krampfhaften Zuckungen, sondern erscheint mehr wie gelähmt.  
 12<sup>b</sup> 47 Tier sitzt wieder auf.  
 12<sup>b</sup> 50 Tier ist erholt.  
 12<sup>b</sup> 54 vollständig munter, lebt > als 12 Std.
- No. 53, 240 g.  
 3<sup>b</sup> 51—53 1,5 ccm Mischung iv.  
 3<sup>b</sup> 54—55 0,02 Rinderserum in 0,5 Vol. iv.  
 3<sup>b</sup> 57 Tier ganz ruhig.  
 4<sup>b</sup> 01 atmet etwas schwer.  
 4<sup>b</sup> 05 ganz ruhig.  
 4<sup>b</sup> 25 ebenso; lebt > als 12 Std.

Die Resultate dieser Versuche sind nochmals in der nebenstehenden Tabelle XX übersichtlich zusammengestellt.

Mit absoluter Unzweideutigkeit ergibt sich aus der Tabelle, daß es in jedem Falle gelingt, durch entsprechende Dosen von Kochsalzlösung bzw. Kochsalzlösung mit 1-proz. CaCl<sub>2</sub>-Zusatz die Tiere vor der Anaphylaxie zu bewahren bei Verwendung von Dosen des Reinjektionsserums, die

---

1) Ein Teil der Tiere starb im Verlauf des folgenden Tages im wesentlichen wohl an den Folgen des operativen Eingriffs; andere Tiere aber, die die Anaphylaxie überstanden hatten, blieben am Leben.

Tabelle XX.

Die Injektion der Salzlösung wurde stets in das zentrale Ende der linken Jugularis, die des Reinjektionsserums entsprechend in die andere Jugularis vorgenommen. Die Salzinjektion dauerte 1—1½ Minuten. Die Seruminjektion erfolgte 1—2 Minuten später möglichst schnell.

## Aktiv anaphylaktische Tiere.

Nummer des Tieres	Gewicht g	Vorbehandlung	Dosis der Salzinjektion	Dosis der Reinjektion nach 13 Tg. pro 100 g Körpergewicht	Klinische Symptome	Lebt	Tot
Meersch. 62	200	0,01 Rinderser. subkutan	—	0,002 Rinderser. typ.	Anaphylaxie	bleibt am Leben, wird später entblutet	—
" 56	230	dgl.	—	0,005 "	dgl.	—	nach 5 Min.
" 52	260	dgl.	—	0,005 "	dgl.	bleibt am Leben, wird später entblutet	—
" 48	280	dgl.	—	0,01	dgl.	erholt sich, wird entblutet	—
" 45	270	dgl.	—	0,01	dgl.	—	nach 4 Min.
" 46	260	dgl.	—	0,01	dgl.	—	" 3 "
" 63	190	dgl.	—	0,01	dgl.	—	" 6 "
" 60	250	dgl.	—	0,02	dgl.	—	" 3 "
" 58	250	dgl.	—	0,02	dgl.	—	" 5 "
" 50	260	dgl.	1,0 Kochsalzlösung <sup>1)</sup>	0,01	keinerlei Sympt.	> als 12 Stunden	—
" 47	220	dgl.	1,0 Mischung <sup>2)</sup>	0,01	dgl.	dgl.	—
" 61	180	dgl.	1,0 "	0,01	dgl.	dgl.	—
" 53	240	dgl.	1,5 "	0,02	dgl.	dgl.	—
" 54	260	dgl.	1,0 Kochsalzlösung	0,02	deutl. Anaphylaxie	dgl.	—
Kontrolle <sup>3)</sup> 57	200	dgl.	2,0 Normalmeersch.-Ser.	0,04	typ. Anaphylaxie	—	nach 6 Min.
" 64	200	dgl.	2,0 "	0,02	dgl.	—	" 5 "

1) Gesättigte NaCl-Lösung. — 2) Eine gleiche Kochsalzlösung mit 1 Proz. CaCl<sub>2</sub>. — 3) Diese Kontrollen wurden angestellt, um zu demonstrieren, daß nicht die Flüssigkeitszufuhr an sich den Ausbruch der Anaphylaxie verhindert.

in jedem Falle schwerste Anaphylaxie und bis auf einen Fall anaphylaktischen Tod bei den Kontrolltieren hervorriefen. Erst bei größeren Dosen des Reinjektionsserums (0,02 ccm) war in einem Fall Anaphylaxie aufgetreten, die allerdings nicht letal verlief, während bei der gleichzeitigen Steigerung der Salzdosis auch hier die anaphylaktischen Symptome vollständig unterdrückt wurden.

## II. Versuche an passiv anaphylaktischen Tieren.

### XXI. Versuch.

23. VIII. 20 Meerschweinchen, No. 103—122, mit je 1,25 Kaninchenserum No. 2 (Kaninchen vorbehandelt mit Hühnerserum) ip. vorbehandelt.
24. VIII. Reinjektion mit frischem Hühnerserum, die angegebenen Dosen beziehen sich auf 100 g Körpergewicht.

#### a) Vorversuch:

Auswertung des anaphylaktischen Zustandes.

- No. 110, 280 g.  
 11<sup>b</sup> 28 0,5 Hühnerserum iv.  
 11<sup>b</sup> 29 starke Anaphylaxie.  
 11<sup>b</sup> 31 Tier liegt auf der Seite, atmet schwer.  
 11<sup>b</sup> 33 vereinzelte Atemzüge, Reflexe erloschen.  
 11<sup>b</sup> 34 tot.
- No. 103, 220 g.  
 11<sup>b</sup> 53 0,25 Hühnerserum in 1,0 Vol. iv.  
 11<sup>b</sup> 54<sup>1</sup>/<sub>2</sub> starke Anaphylaxie, Tier legt sich auf die Seite, starke Krämpfe.  
 11<sup>b</sup> 55 Reflexe erloschen, vereinzelte Atemzüge. Abgang von Urin und Kot.  
 11<sup>b</sup> 57 tot.
- No. 108, 250 g.  
 12<sup>b</sup> 4 0,05 Hühnerserum in 1,0 Vol. iv.  
 12<sup>b</sup> 5 unruhig, schnuppert, schüttelt mit dem Kopf.  
 12<sup>b</sup> 7 starke anaphylaktische Krämpfe, Tier legt sich auf die Seite, vereinzelte agonale Atemzüge.  
 12<sup>b</sup> 8 Reflexe erloschen.  
 12<sup>b</sup> 9 tot.
- No. 104, 230 g.  
 12<sup>b</sup> 14 0,03 Hühnerserum in 1,0 Vol. iv.  
 12<sup>b</sup> 15 Tier kratzt sich, springt auf, unruhig.  
 12<sup>b</sup> 16 anaphylaktische Krämpfe, anhaltende Sprünge.  
 12<sup>b</sup> 16<sup>1</sup>/<sub>2</sub> legt sich auf die Seite, tiefe Agone.  
 12<sup>b</sup> 17 Reflexe erloschen, Abgang von Urin und Kot.  
 12<sup>b</sup> 18 tot.

No. 119, 230 g.

1<sup>b</sup> 53 0,015 Hühnerserum in 1,0 Vol. iv.

1<sup>b</sup> 54 anaphylaktische Sprünge.

1<sup>b</sup> 55 Tier legt sich auf die Seite, wälzt sich herum, schwere Krämpfe.

1<sup>b</sup> 55<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Reflexe erloschen, noch vereinzelte tiefe Atemzüge.

1<sup>b</sup> 57 Blutentnahme in Agone.

No. 113, 170 g.

4<sup>b</sup> 29<sup>1</sup>/<sub>2</sub>—30 0,015 Hühnerserum in 0,5 Vol. iv.

4<sup>b</sup> 31 deutliche Anaphylaxie, kratzt sich.

4<sup>b</sup> 32 sehr unruhig, Sprünge, wirft sich auf die Seite, starke Krämpfe,  
wälzt sich im Käfig.

4<sup>b</sup> 34 Reflexe erloschen.

4<sup>b</sup> 35 tot.

No. 121, 190 g.

6<sup>b</sup> 37 0,015 Hühnerserum in 0,5 Vol. iv.

6<sup>b</sup> 38 deutliche Anaphylaxie, kratzt sich, springt hoch auf.

6<sup>b</sup> 39 wirft sich auf die Seite, sehr starke Krämpfe.

6<sup>b</sup> 42 Reflexe erloschen, tot.

No. 106, 170 g.

5<sup>b</sup> 57 0,01 Hühnerserum in 0,5 Vol. iv. (bei der Injektion ging etwas  
verloren.

5<sup>b</sup> 59 Tier schüttelt mit dem Kopf, schnuppert, zittert, sträubt das Fell.

7<sup>b</sup> 00 krampfartige Zuckungen, Sprünge.

7<sup>b</sup> 02 Tier erholt sich.

Am folgenden Tage tot.

No. 115, 230 g.

12<sup>b</sup> 30 0,005 Hühnerserum in 1,0 Vol. iv.

12<sup>b</sup> 32—34 Tier schnuppert, kratzt sich, deutliche Atembeschwerden.

12<sup>b</sup> 35 Tier sehr matt.

12<sup>b</sup> 37 Tier erholt sich etwas, wird zusehends munterer.

12<sup>b</sup> 43 Atmung etwas frequent, sonst munter.

Am folgenden Tage tot.

Kontrolle.

Meerschweinchen, 200 g, nicht vorbehandelt.

11<sup>b</sup> 43 0,5 Hühnerserum iv., absolut keine Symptome.

Wir sehen, daß bei den passiv anaphylaktisch gemachten Tieren in jedem Fall noch 0,015 Hühnerserum pro 100 g Körpergewicht anaphylaktischen Tod bewirkte und 0,01 und 0,005 noch sicher krankmachende Dosen darstellten.

Die sicher letale Dosis 0,015 wurde nun in den folgenden Versuchen mit vorhergehender Salzinjektion durchgehend angewandt.

## b) Versuche mit prophylaktischen Salzinjektionen.

No. 105, 200 g.

1<sup>h</sup> 19<sup>3</sup>/<sub>4</sub>—20<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 0,5 Mischung auf 1 ccm mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt iv.1<sup>h</sup> 21<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 0,015 Hühnerserum in 0,5 Vol. iv.1<sup>h</sup> 24 Tier zittert etwas, sonst keinerlei Symptome, bleibt völlig gesund; lebt > 12 Std.

No. 107, 190 g.

1<sup>h</sup> 37—38<sup>3</sup>/<sub>4</sub> 0,6 Mischung auf 1 ccm mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt iv.1<sup>h</sup> 40 0,015 Hühnerserum in 0,5 Vol. iv.1<sup>h</sup> 45 Tier etwas matt, sonst keinerlei Symptome.4<sup>h</sup> 00 Tier völlig munter; lebt > als 12 Std.

No. 111, 230 g.

2<sup>h</sup> 10<sup>1</sup>/<sub>4</sub>—12 0,7 Mischung auf 1 ccm mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt iv.2<sup>h</sup> 12<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 0,015 Hühnerserum in 1,0 Vol. iv.2<sup>h</sup> 14<sup>1</sup>/<sub>4</sub> Tier schnuppert etwas, sonst keinerlei Symptome.4<sup>h</sup> 00 Tier völlig munter; lebt > als 12 Std.

No. 109, 200 g.

5<sup>h</sup> 38—39 0,7 Mischung auf 1 ccm mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt iv.5<sup>h</sup> 40 0,015 Hühnerserum in 0,5 Vol. iv.5<sup>h</sup> 42 Tier matt, zittert etwas, sonst munter, erholt sich bald; lebt > als 12 Std.

No. 112, 190 g.

6<sup>h</sup> 21<sup>1</sup>/<sub>2</sub>—22<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 0,6 Mischung auf 1,0 mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt iv.6<sup>h</sup> 23<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 0,015 Hühnerserum in 0,5 Vol. ip.6<sup>h</sup> 25 keinerlei Symptome, auch weiterhin keine Symptome.8<sup>h</sup> 00 völlig munter, lebt > als 12 Std.

No. 118, 200 g.

7<sup>h</sup> 10—11<sup>1</sup>/<sub>2</sub> 0,7 Mischung auf 1,0 mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt (etwa <sup>3</sup>/<sub>4</sub> des Volums in die Vena jugularis, <sup>1</sup>/<sub>4</sub> in das Peritoneum).7<sup>h</sup> 14 0,015 Hühnerserum in 0,5 Vol. iv.

Tier bis 8 Uhr keinerlei Symptome, völlig munter; lebt 12 Std.

Stirbt am anderen Morgen.

Die Resultate dieser Versuche sind nochmals übersichtlich in der nebenstehenden Tabelle XXI niedergelegt.

Eine analoge Versuchsreihe, in der ein mehrfaches Multiplum der sicher Anaphylaxie auslösenden Dosis des Reinjektionsserums und größere Salzmengen gegeben wurden,

Tabelle XXI.  
Passiv anaphylaktische Tiere.

Nummer des Tieres	Gewicht in g	Vorbehandlung	Dosis der Salzinjektion	Dosis der Reinjektion nach 24 Std. pro 100 g Körpergewicht	Klinische Symptome	Lebt	Tot
Meerschw. 110	280	1,25 Ser., Kaninchen vorbeh. mit Huhn intraperitoneal	—	0,5 Hühnerser.	typische Anaphylaxie	—	nach 5 1/2 Min.
" 103	220	dgl.	—	0,25 "	dgl.	—	4 "
" 108	250	dgl.	—	0,05 "	dgl.	—	5 1/2 "
" 104	230	dgl.	—	0,03 "	dgl.	—	3 1/2 "
" 119	230	dgl.	—	0,015 "	dgl.	—	4 "
" 113	170	dgl.	—	0,015 "	dgl.	—	5 "
" 121	190	dgl.	—	0,015 "	dgl.	—	5 1/2 "
" 106	170	dgl.	—	0,01 "	leichte Anaphylaxie	—	"
" 115	230	dgl.	—	0,005 "	schwache Anaphylaxie	> als 12 Std.	dgl.
Kontrolle	210	nicht vorbehandelt	—	0,5 "	keinerlei Symptome	dgl.	—
Meerschw. 105	200	1,25 Ser., Kaninchen vorbeh. mit Huhn intraperitoneal	0,5 Mischung <sup>1)</sup>	0,015 "	dgl.	—	—
" 107	190	dgl.	0,6 "	0,015 "	dgl.	dgl.	—
" 111	230	dgl.	0,7 "	0,015 "	dgl.	dgl.	—
" 109	200	dgl.	0,7 "	0,015 "	dgl.	dgl.	—
" 112	160	dgl.	0,6 "	0,015 "	dgl.	dgl.	—
" 118	200	dgl.	0,7 "	0,015 "	dgl.	dgl.	—

1) Mit physiologischer Kochsalzlösung stets auf 1,0 ccm aufgefüllt.



ergab in gleicher Weise bei sämtlichen Kontrolltieren (3) typische Anaphylaxie, bei den mit Salz behandelten Tieren keinerlei Symptome. Wir verweisen bezüglich dieser Versuche auf Tabelle XXII.

Die völlige Eindeutigkeit der Resultate erübrigt uns näher auf sie einzugehen.

Es sei nur kurz darauf hingewiesen, daß eine Dosis des Reinjektionsserums, die in jedem Falle im Kontrollversuch den Tod an Anaphylaxie bewirkte und das 3-fache Multiplum der krankmachenden Dosis darstellte, bei den mit Salz behandelten Tieren in keinem Falle auch nur die geringsten Spuren von Anaphylaxie auslöste.

Diese Versuche über Salzinjektion führen zu dem unzweideutigen Ergebnis, daß unter geeigneten Versuchsbedingungen die beim Kontrolltier sicher eintretende Anaphylaxie bei dem mit Salz behandelten Tier sich verhüten läßt.

Es war nun für uns von Interesse, darüber Forschungen anzustellen, ob die Voraussetzung, von der wir bei den Salzversuchen ausgegangen sind, richtig war. Wir hatten ja angenommen, daß die Anaphylaxie bedingt sei durch eine Komplementverankerung an der Eiweiß-Antieißverbindung und daß die Salzbehandlung diese verhüten müsse, entsprechend der Fähigkeit hypertotonischer Lösungen die Komplementverankerung zu hemmen.

War diese Voraussetzung richtig, d. h. war die günstige Wirkung des Salzes dadurch bedingt und nicht etwa auf andere Wirkungen (z. B. Einfluß auf Zirkulation und Atmung) zurückzuführen, so durfte die sonst reguläre Komplementverarmung nach der Reinjektion unter dem Einfluß der Salzbehandlung nicht oder nur in geringerem Grad eintreten.

Wir haben zur Entscheidung dieser Frage bei einer Reihe von Meerschweinchen, die in der nebenstehenden Tabelle aufgeführt sind, Blut vor und nach der Reinjektion entnommen und das Serum auf seinen Komplementgehalt titriert.

Diese Versuche sind nur bei passiven Tieren angestellt, weil wir hier bei der an sich starken Komplementverarmung nach der Reinjektion eher große Differenzen erwarten durften.

## XXII. Versuch.

26. VIII. Meerschweinchen vorbehandelt mit je 1,25 präzipitiertes Kaninchenserum No. 2.

27. VIII. Reinjektion intravenös mit Hühnerserum; bei einigen Tieren vorher Salzinjektion.

Blutentnahme zur Komplementtitration vor und nach der Reinjektion.

Meersch. No.	Gewicht in g	Dosis des intrap. injiz. präzip. Ser.	Dosis d. injiziert. Salzmischung	Dosis d. Reinj. n. 24 Sdt. pro 100 g Körpergewicht (Hühnerserum)	Blut-entnahme	Hämolyse mit Komplement- mengen in 1 ccm Volumen									
						0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,008	
126	200	1,25	—	0,05	vor der Reinjekt. 4' n. d. Reinjekt.	0	0	0	+	+	+	0	0		Typhische Anaphylaxie
151	230	1,25	—	0,05	vor der Reinjekt. 9' n. d. Reinjekt.	0	0	0	+	+	+	+	0		Sehr starke Anaphylaxie. Beginn 2 1/2' post reinject.
127	210	1,25	1,3	0,05	vor der Reinjekt. 3' n. d. Reinjekt.	+	+	+	+	+	+	±	0		Keinerlei Anaphylaxiesymptome
157	200	1,25	—	0,05	4' n. d. Reinjekt.	±	0	0	0	0	0	0			Typhische Anaphylaxie
128	280	1,25	1,5	0,05	10 1/2' n. d. Reinjekt.	+	+	+	+	±	0	0			Keinerlei Anaphylaxiesymptome
155	190	1,25	1,0	0,05	6 1/2' n. d. Reinjekt.	+	+	0	0	0	0	0			Keinerlei Anaphylaxiesymptome

Wir sehen hier bei den Kontrolltieren, welche ohne Verabreichung von Salz nach der Reinjektion typische Anaphylaxie zeigten (No. 126 und 151), den völligen Komplementschwund, den wir schon in zahlreichen früheren Versuchen (s. Tabelle XI—XIII) beobachtet haben.

Ganz anders aber verhält sich das mit Salz vorbehandelte Tier 127. Vor der Reinjektion war sein Titer sogar geringer als der des Serums 151, im Anschluß an die Reinjektion, die von keinerlei anaphylaktischen Symptomen gefolgt war, ist nur eine ganz geringgradige Komplementverarmung eingetreten.

In den weiteren Versuchen ist leider aus äußeren Gründen die Blutentnahme vor der Reinjektion unterblieben, aber auch hier sehen wir im Vergleich zu dem Kontrolltier 157 eine Erhaltung des größeren Teiles des Komplementes nach der Reinjektion.

Allerdings macht sich eine gewisse Verringerung auch bei den Salztieren bemerkbar, wie besonders das Tier 127 deutlich zeigt (vorher und nachher entnommen) und wie sich auch bei den beiden anderen Tieren 128, 155 vermuten läßt, wenn wir auch hier, wegen der nicht erfolgten Blutentnahme, vor der Reinjektion nicht sicher entscheiden können, ob und wie weit der nachher vorhandene Titer gegenüber dem vor der Reinjektion differierte.

Jedenfalls zeigen uns also die Salzversuche, daß die Verhinderung der Komplementverankerung keine absolute ist. Ein geringer Teil des Komplementes wird immer noch gebunden, aber offenbar ist die Menge, die kurz nach der Reinjektion zur Verankerung gelangt, zu gering, um eine nachweisbare Vergiftung hervorzurufen.

Mit der Rückkehr zur Isotonie wird wahrscheinlich gradatim mehr und mehr von dem Komplement verankert, aber die in einem gegebenen Zeitpunkt gebundene Komplementmenge erreicht wohl nie die Dosis, die zur Auslösung der Anaphylaxie notwendig ist.

In analoger Weise wie Biedl und Kraus bei Hunden hat der eine von uns (F.) in Gemeinschaft mit Dr. Groeber die Blutdruck- und Atemkurve bei anaphylaktischen Kaninchen und Meerschweinchen studiert. Es erschien uns nun von Interesse, im Anschluß an unsere Versuche über die Komplementverarmung beim anaphylaktischen Tier mit und ohne Salzbehandlung die Registriermethode auch hier anzuwenden und zu untersuchen, ob die nach der Reinjektion zu beobachtende charakteristische Blutdruck- und Atemkurve durch die Salzbehandlung gewisse Modifikationen erleidet oder ob sogar die für die Anaphylaxie typischen Eigentümlichkeiten der Kurve ganz ausgelöscht würden.

Wir bringen im nachstehenden einige hierhergehörige Versuche, die an Kaninchen angestellt wurden, nebst Kurven von Blutdruck und Atmung (s. Tafel II). Auf eine nähere

Analyse dieser Kurven wollen wir an dieser Stelle nicht eingehen, wir verweisen auf die demnächst erscheinende Publikation. Hier soll nur kurz die Beeinflussung der Kurven durch die Salzinjektion besprochen werden.

Kaninchen No. 92 und 94 waren vorbehandelt wie folgt:

24. VII. je 1,5 Hammelserum intravenös.  
10. VIII. je 0,5 Hammelserum intravenös.  
22. VIII. Kaninchen No. 92, 2950 g. Salzdosis: 2,0 gesättigte Mischung pro Kilo Tier, Serumdosis: 3,0 pro Kilo Tier, beides in Ohrvene.  
10<sup>h</sup> 10—12<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Salzinjektion 6,0 ccm.  
10<sup>h</sup> 17—18 Seruminjektion (9,0 ccm Hammelserum). Der Druck sinkt ganz allmählich, aber die Pulscurve zeigt keine Irregularitäten. Keine Abnormität der Atmung.  
10<sup>h</sup> 31 Versuch unterbrochen bei steigender Tendenz des Pulses. Tier bleibt leben.  
22. VIII. Kaninchen No. 94, 3010 g. Kontrolle ohne Salz; Serumdosis 3,0 Serum pro Kilo Tier.  
11<sup>h</sup> 32<sup>1</sup>/<sub>2</sub>—33 Seruminjektion (9,0 ccm Hammelserum): deutliche Drucksenkung und Vaguspulse; veränderter Atemtypus.  
11<sup>h</sup> 43 Versuch unterbrochen bei niederem Druck. Tier bleibt leben.

(Siehe Tafel II, Kurve 1 und 2.)

Die beiden Kurven zeigen die kolossalen Unterschiede in dem Verhalten von Puls und Atmung bei dem mit Salz behandelten anaphylaktischen Tier im Vergleich zu der Kontrolle ohne Salz im Anschluß an die Reinjektion. Bei dem Kontrolltier sehen wir charakteristische Veränderungen der Atmung, deutliche Senkung des Blutdrucks und wiederholtes Auftreten von typischen Vaguspulsen. Dagegen zeigt das prophylaktisch mit Salz gespritzte Tier zwar auch eine allmählich zunehmende geringe Blutdrucksenkung, aber doch keine Irregularität in dem Kurvenbilde vor und nach der Reinjektion. Noch deutlicher tritt diese Differenz uns in einem weiteren Versuche vor Augen, in dem an Stelle der „Salzmischung“ eine gesättigte NaCl-Lösung benutzt wurde.

Kaninchen No. 93 und 100, vorbehandelt wie vorige.

23. VIII. Kaninchen No. 93, 2030 g. Salzdosis: 2,5 ccm gesättigter Lösung pro Kilo Tier; Serumdosis: 4,0 ccm Hammelserum pro Kilo Tier.  
12<sup>h</sup> 04<sup>1</sup>/<sub>2</sub>—6 Salzinjektion (5,0 ccm gesättigte NaCl-Lösung).  
12<sup>h</sup> 07<sup>1</sup>/<sub>2</sub>—08 Seruminjektion (8,0 ccm): keine Pulsveränderung; keine Abnormität der Atmung; geringe Drucksenkung.  
12<sup>h</sup> 30 Versuch unterbrochen. Tier bleibt leben.

23. VIII. Kaninchen No. 100, 2020 g. Kontrolle ohne Salz: Serumdosis 4,0 ccm Hammelserum pro Kilo Tier.

1<sup>h</sup> 45—46 Seruminjektion (8,0 ccm); bedeutende Drucksenkung; Vaguspulse; Aenderung der Atemkurve. Blutdruck steigt später etwas, bleibt aber andauernd sehr nieder.

2<sup>h</sup> 04 Versuch abgebrochen, Tier lebt.

(Siehe Tafel II, Kurve 3 und 4.)

Hier sehen wir also infolge der Reinjektion bei der Kontrolle eine ganz enorme Blutdrucksenkung und Veränderung der Pulskurve und auch eine ganz bedeutende Beeinflussung der Atmungskurve durch die Reinjektion. Dagegen zeigt das mit Salz behandelte Tier nach der Injektion der gleichen Serumdosis so gut wie gar keine Veränderung seiner Puls- und Atmungskurve.

Derartige Resultate, die besonders schön die Verhütung der Anaphylaxie infolge der Salzinjektion vor Augen führen, haben wir am Kaninchen noch in weiteren Versuchen stets erhalten, und in gleicher Weise ist es uns geglückt, analoge Unterschiede bei großen Meerschweinchen mit dem Kymographion zur Darstellung zu bringen, wobei wir allerdings nur die Pulskurve, nicht aber zugleich die Atmungskurve schreiben konnten.

Ein weiterer indirekter Beweis dafür, daß die Verankerung des Komplements bei der Auslösung der Anaphylaxie notwendig ist, läßt sich noch auf Grund folgender Erwägung erbringen: Aus den Versuchen von Wechsberg<sup>1)</sup> wissen wir, daß ein vom Säuger stammendes auch hochwertiges Anti-Metschnikoff-Serum im Gegensatz zu dem vom Vogel stammenden bei der Infektion der Taube mit V. Metschnikoff gänzlich versagt, weil nach Wechsberg das Vogelkomplement nicht auf den Säugerambozeptor paßt. In analoger Weise ergibt sich aus den Versuchen von Moreschi<sup>2)</sup> über Komplementablenkung, daß eine Verbindung von Eiweiß mit einem vom Vogel stammenden Antieiweißkörper Säugerkomplement zu verankern nicht imstande ist, weil offenbar für dieses Komplement in der Verbindung keine passende Gruppe vorhanden ist. Ein analoges Verhalten gilt umgekehrt für das Vogelkomplement in seiner Beziehung zum Säugerantikörper.

1) Wiener klin. Wochenschr., 1902.

2) I. Tagung der freien Vereinigung f. Mikrobiologie, 1906.

Auf Grund dieses eigentümlichen Verhaltens durfte es nach unseren Voraussetzungen nicht gelingen, mit einem sei es auch noch so wirksamen Vogelpräzipitin, die Anaphylaxie passiv auf sonst empfängliche Säuger (Meerschweinchen) zu übertragen, einerlei ob dieses Vogelpräzipitin selbst gegen Vogel- oder gegen Säugereiweiß gerichtet ist.

In der Tat haben Uhlenhuth und Händel, wie sie in einer Anmerkung zu ihrer Arbeit über „Nekrotisierende Wirkung normaler Sera speziell des Rinderserums“ kurz erwähnen, die Beobachtung gemacht, daß ein Pferdeantiserum vom Huhn nicht imstande ist, Meerschweinchen passiv anaphylaktisch zu machen. Die Autoren vermuten ganz richtig bereits „einen gewissen Zusammenhang mit dem Komplement-bindungsphänomen“, wie er schon in der ersten Arbeit von Friedberger (Kritik der Theorien etc.) für die Anaphylaxie angenommen worden ist und durch unsere quantitativen Komplementbestimmungen und die Salzversuche experimentell bewiesen ist.

Leider stand uns ein genügend wirksames Antieiweißserum vom Vogel nicht zur Verfügung, um unsere Versuche in dieser Richtung auszubauen.

Wenn aber unsere Voraussetzung richtig war, so dürfte umgekehrt auch unser beim Meerschweinchen hochwirksames Säugerpräzipitin (Kaninchen vorbehandelt mit Hammelserum) die Anaphylaxie nicht passiv auf eine sonst empfängliche Vogelspecies übertragen. Das ist uns in der Tat, wie wir vermutet haben, auch nicht gelungen.

#### XXIII. Versuch.

3. VIII. 2 weiße Tauben erhalten je 1,0 ccm Kaninchenserum No. 64 ip.
4. VIII. Reinjektion mit 0,8 frischem Hammelserum in die Flügelvene; keinerlei Symptome.

#### XXIV. Versuch.

4. VIII. 1) junge braune, 2) braun-weiße Taube je 1,0 ccm Kaninchenserum No. 64 ip.
5. VIII. Reinjektion mit 1,0 frischem Hammelserum in die Flügelvene; keinerlei Symptome.

Zwei gleicherweise vorbehandelte Meerschweinchen No. 118, 160 g, No. 119, 160 g erliegen der intravenösen Reinjektion von 0,4 Hammelserum an typischer Anaphylaxie in 5 Min.

## XXV. Versuch.

17. VIII. Schwarze Taube linker Flügel gestutzt und braune Taube beide Flügel gestutzt je 1,0 ccm Kaninchenserum No. 66 ip.
18. VIII. Schwarze Taube linker Flügel gestutzt, 0,5 Hammelserum in die Flügelvene; Tier zeigt keinerlei Symptome.
18. VIII. Braune Taube beide Flügel gestutzt, 1,0 Hammelserum in die Flügelvene; Tier zeigt keinerlei Symptome.

Da es bei diesen Versuchen nicht auf die Herkunft des Antigens, sondern auf die Abstammung des Antieiweißkörpers ankommt, so war ein anderes Resultat auch nicht zu erwarten bei Verwendung eines gegen Vogeleiweiß gerichteten Säugerantikörpers an Stelle des gegen Säuger gerichteten. Das zeigen die folgenden Versuche.

## XXVI. Versuch.

26. VIII. 2 weiße Tauben werden ip. mit dem Serum eines mit Hühnerserum vorbehandelten Kaninchens No. 2 ip. geimpft, Dosis 1,0 ccm.
27. VIII. Reinjektion von 1,0 Hühnerserum in die Flügelvene; Tiere zeigen keinerlei Symptome.

Ueber die Wirkung des gleichen präzipitierenden Serums am Meerschweinchen siehe Versuch XXI.

Obwohl dieses Resultat unseren theoretischen Voraussetzungen entsprach, mußte man doch immer an die Möglichkeit denken, daß bei Vögeln überhaupt die Anaphylaxie nicht eintrete.

Da bisher an Vögeln, so weit die Literatur uns zugänglich war, überhaupt eingehende Anaphylaxieversuche nicht angestellt zu sein scheinen<sup>1)</sup>, so haben wir zunächst eine größere Anzahl von Versuchen in der Richtung unternommen, ob überhaupt Vögel aktiv-anaphylaktisch zu machen sind.

Wir benutzten für diese Versuche, ebenso wie in den vorhergehenden Experimenten, Tauben, die wir sowohl mit Säugerserum (Hammel), als auch mit Vogelserum (Huhn) vorbehandelten.

Wir haben im ganzen folgende 4 Versuchsreihen angestellt:

---

1) Anmerkung bei der Korrektur: Uhlenhuth berichtet auf der jüngsten Tagung der Gesellschaft für Tropenhygiene, daß es ihm nicht gelungen sei, Hühner anaphylaktisch zu machen. Uns ist es dagegen allerdings erst nach mehrmaliger Vorbehandlung geglückt, auch bei dieser Species typische Anaphylaxie zu erzeugen und ebenso bei der Ente.

XXVII. Versuch.

24. VII. 5 Tauben erhalten je 1,0 Hammelserum iv.

XXVIII. Versuch.

29. VII. 5 Tauben erhalten je 0,75 Hühnerserum iv.

XXIX. Versuch.

13. VIII. 5 Tauben erhalten je 0,01 Hammelserum subkutan.

XXX. Versuch.

14. VIII. 5 Tauben erhalten je 0,01 Hühnerserum subkutan.

Die Reinjektionen erfolgten bei der ersten Serie am 12. VIII. (2 Tiere) bzw. am 25. VIII. (3 Tiere). Die intravenös gegebenen Reinjektionsdosen betrugen 1,0 resp. 0,5 Hammelserum.

Die am 29. VII. mit Hühnerserum präparierten Tiere wurden am 23. VIII. reinjiziert. Die Dosen betrugen 1,0, 0,75, 0,5, 0,3, 0,2 Hühnerserum.

Die dritte Serie wurde am 13. VIII. vorbehandelt, am 28. VIII. reinjiziert mit Dosen, die zwischen 2,0—0,1 Hammelserum lagen; ebenso die vom 14. VIII. mit entsprechenden Dosen Hühnerserums.

Wir können die Resultate dieser Versuche summarisch behandeln, weil das Ergebnis in allen Fällen in weiten Grenzen unabhängig von der Reinjektionsdosis das gleiche war.

Sämtliche Tiere zeigten Anaphylaxie mit einem ungemein typischen Symptomenbild, das besonders in den beiden ersten Serien charakteristisch ausgesprochen war (so daß wir diese Art der Vorbehandlung für die geeignetere halten).

Symptome der Anaphylaxie bei der Taube:

Wird die Taube unmittelbar nach der Reinjektion in den Käfig zurückgebracht, so ist sie alsbald unruhig, schüttelt wiederholt mit dem Kopf, schnauft, holt tief Atem, die Beine zittern und das Tier setzt sich spontan nieder, atmet schwer mit weit aufgesperrtem Schnabel, aus dem häufig Schleim austritt. Tier läßt Schwanz und Flügel hängen. Häufiges Augenblinzeln. Die Lider und die Haut oberhalb des Schnabels sind intensiv gerötet.

Scheucht man das Tier in diesem Zustand auf, so vermag es nur wenige Schritte taumelnd zu gehen und sinkt dann wieder kraftlos nieder. In die Luft geworfen, macht das Tier einige vergebliche Flügelschläge, läßt sich aber dann zu Boden fallen. Dabei hat es den Anschein, als ob weniger die Flügel



selbst gelähmt wären, es sich vielmehr um Gleichgewichtsstörung handle. Bald vermag das Tier sich nicht mehr auf den Beinen zu halten, auf eine Stange gesetzt, fällt es sofort herunter. Auch auf dem Boden sitzt es nicht mehr auf den Beinen, sondern diese sind abduziert, das Tier ruht auf dem Sternum, den Schnabel oft gegen den Boden gedrückt, als ob der ganze Schwerpunkt des Tieres nach vorn verschoben wäre.

Auf den Rücken oder auf die Seite gelegt, bleibt die Taube mit abduzierten Beinen regungslos liegen. Ungemein charakteristisch ist die Atmung. Von vornherein sehr tief und frequent, nimmt sie immer mehr an Intensität zu, wobei die beiden Flügel und die Schwanzfedern mitbewegt werden, während beim normalen Tier die Bewegungen der Flügel und des Schwanzes bei der Atmung überhaupt nicht zu beobachten sind.

Wenn dieser Zustand eine gewisse Zeit, der bei den einzelnen Tieren zwischen 10—20 Min. schwankt, gedauert hat, so beginnen die Tiere sich zu erholen. Sie setzen sich wieder auf die Beine, die Atmung wird seltener und weniger dyspnoisch, die Tiere sind zwar noch eine Zeitlang matt und zeigen keine Lust zum Fliegen, aber etwa nach 1 Stunde scheinen sie völlig wiederhergestellt.

Dieses ist der gewöhnliche Ausgang.

Nur in einem einzigen Falle sahen wir bei einer relativ großen Dosis der Reinjektion (1,0 Hühnerserum) den Tod ziemlich schnell eintreten <sup>1)</sup>.

Nicht präparierte Kontrolltiere zeigen bei der intravenösen Injektion gleicher oder noch größerer Dosen der betreffenden

---

1) Bei einer erneuten Reinjektion von 1,0 des vorher verwandten Serums nach etwa 5 Wochen ist ein größerer Teil der Tiere an akuter Anaphylaxie 3—5 Minuten nach der intravenösen Injektion erlegen. Die Tiere zeigten sofort nach der Injektion das typische Kopfschütteln; alsbald heftige Dyspnoe, sie fielen nieder, schlugen krampfhaft mit den Flügeln um sich und verendeten nach einigen tiefen Atemzügen in kürzester Zeit. Das Symptomenbild ähnelte bei diesen Tieren ganz dem bei den akut eingehenden Meerschweinchen. Hier konnte ich nun in Gemeinschaft mit cand. med. Joachimoglu auch beobachten, daß das Hämolysin des Taubenserums für Kaninchenblut in der Anaphylaxie abnimmt und ebenso das Komplement des Taubenserums für einen gegen Ziegenblut gerichteten Hühnerambozeptor; wir haben also Verhältnisse, die der Komplementverarmung beim Meerschweinchen entsprechen. (F.)

Sera meistens keinerlei Symptome. In ganz vereinzelt Fällen trat allerdings durch die einfache Seruminjektion bei den Kontrolltauben ein ganz schnell vorübergehendes leichtes Unwohlsein auf, aber die Symptome sind gar nicht zu vergleichen mit denen, wie wir sie bei den anaphylaktischen Tieren gesehen haben.

Die Tauben, die die schwere Anaphylaxie überstanden haben, waren 24 Stunden später ausgesprochen „antianaphylaktisch“, wie wir in einer Zahl von Versuchen feststellen konnten.

Als Beispiel führen wir einen Versuch in extenso an.

#### XXXI. Versuch.

Taube No. 2 aus der Serie Versuch XXVIII am 29. VII. mit 0,75 Hühnerserum iv. vorbehandelt.

23. VIII. 4<sup>b</sup> 58<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, 0,5 Hühnerserum iv.

4<sup>b</sup> 59 Tier unruhig, schüttelt den Kopf, schnauft.

5<sup>b</sup> 00 blinzelt mit den Augen, sperrt den Schnabel auf, Schleimaustritt aus dem Schnabel.

5<sup>b</sup> 01 starkes Zittern der Beine, Tier setzt sich nieder, atmet schwer und häufig.

5<sup>b</sup> 02 auf den Rücken gelegt, erhebt es sich, versucht einige Schritte zu laufen, sinkt aber kraftlos nieder.

5<sup>b</sup> 07 auf den Rücken oder Seite gelegt, vermag das Tier sich nicht mehr zu erheben. In die Höhe geworfen, läßt es sich auf den Boden fallen.

5<sup>b</sup> 13 Tier setzt sich wieder auf und erholt sich zusehends.

5<sup>b</sup> 30 Tier auf die Stange gesetzt, bleibt wieder spontan sitzen, Atmung ruhig; in die Luft geworfen, fliegt das Tier etwas, wenn auch matt.

6<sup>b</sup> 00 Tier wieder völlig erholt.

24. VIII. Prüfung auf Antianaphylaxie.

10<sup>b</sup> 00 1,0 Hühnerserum in die Flügelvene: keinerlei Symptome.

Die geschilderten Symptome sind nicht etwa für die Taube charakteristisch; wir beobachteten sie z. B. auch bei einem Huhn, das wir zur Gewinnung von Präzipitin wiederholt mit Hammelserum behandelt hatten, und bei der Ente.

Auch das Huhn war nach einem typisch anaphylaktischen Anfall 24 Stunden nachher antianaphylaktisch geworden, erlag aber etwa 14 Tage später einer erneuten intravenösen Injektion mit typischer Anaphylaxie.

### Zusammenfassung.

1) Entsprechend dem Wesen der Anaphylaxie als Eiweiß-Antieiweißreaktion (Friedberger) ist, analog dem Vorgang *in vitro*, beim anaphylaktischen Meerschweinchen als Folge der zweiten Injektion während der Anaphylaxie konstant eine Komplementverarmung im Serum nachzuweisen.

2) Diese Komplementverarmung ist beim aktiv anaphylaktischen Tier weniger deutlich ausgesprochen als beim passiven, bei dem sie zum nahezu völligen Komplementschwund führt.

3) Die akute Komplementverarmung an sich ist nicht als Ursache der Anaphylaxie zu betrachten, denn durch reichliche Zufuhr von Komplement wird die Anaphylaxie nicht verhütet.

4) Mittel, die eine Komplementverankerung im Reagenzglas verhindern, wie konzentrierte Kochsalzlösung, vermögen auch bei vorheriger intravenöser Injektion den Ausbruch der Anaphylaxiesymptome im aktiv wie passiv präparierten Tier zu verhüten.

5) Bei mit Salz vorgespritzten Tieren ist die Komplementverarmung während der Anaphylaxie bedeutend geringer als bei nicht mit Salz behandelten Kontrollen.

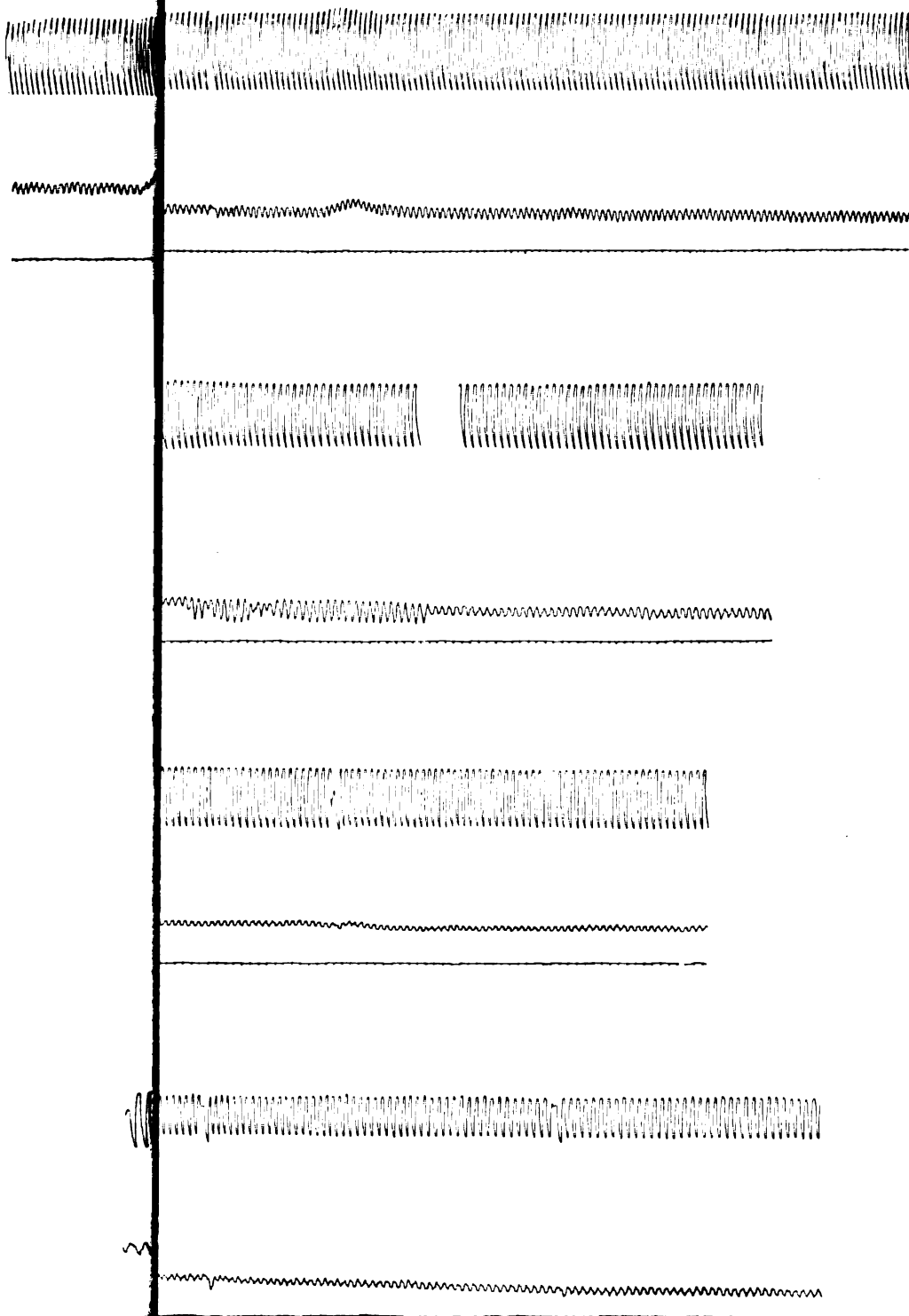
6) Das spricht dafür, daß die Komplementverankerung mit der Anaphylaxie in ursächlichem Zusammenhang steht.

7) Dafür spricht auch, daß ebenso wie es nicht gelingt, mit einem Vogelpräzipitin Säuger anaphylaktisch zu machen (Uhlenhuth und Händel), es auch nicht gelingt, mit einem Säugerpräzipitin Vögel passiv zu anaphylaktisieren. Wir vermuten mit Uhlenhuth und Händel, daß dies auf der Unmöglichkeit der Komplementverankerung unter diesen Verhältnissen beruht.

8) Aktiv lassen sich Vögel mit Säuger- und Vogeleiweiß regelmäßig anaphylaktisch machen.

Zeits

Tafel II.



Fr

Verlag von Gustav Fischer in Jena.



# Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. III. No. 7.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

## **Zur Frage der Bakterienanaphylaxie.**

Von Dr. Th. Holobut (Lemberg).

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. September 1909.)

Aus den Untersuchungen von Rosenau und Anderson, Kraus und Doerr über Bakterienanaphylaxie hat sich ergeben, daß sich im Bakterienleibe neben anderen Antigenen auch ein Antigen (Sensibilisinogen) findet, welches bei Meerschweinchen einen spezifischen Antikörper (anaphylaktischer Reaktionskörper, Sensibilisin) hervorzurufen imstande ist.

Die Autoren konnten außerdem konstatieren, daß die so gewonnene Bakterienanaphylaxie im hohen Grade spezifisch ist. Wichtig für die Annahme einer Anaphylaxie war noch der Nachweis (Kraus und Doerr), daß es auch möglich sei, durch intraperitoneale Injektion von gesunden Tieren mit dem Serum anaphylaktischer Tiere passive Anaphylaxie zu erzeugen.

Es war somit speziell durch den letzten Versuch erwiesen, daß es sich tatsächlich um Anaphylaxie und nicht um Giftempfindlichkeit der sensibilisierten Tiere handelt.

Gegen die Tatsache, daß es möglich ist, bei Tieren Bakterienanaphylaxie zu erzeugen, wendeten sich in einer kurzen Notiz Weil und Braun<sup>1)</sup>.

Es war nun zunächst zu untersuchen, worauf die Divergenz dieser Befunde beruhe. Die daraufhin gemachten Untersuchungen zeigten, daß es sich offenbar um Fehler in der Versuchsanordnung der letztgenannten Autoren handeln dürfte.

Injiziert man nämlich Meerschweinchen mit einer größeren oder geringeren Menge Bakterienaufschwemmung ein oder wenige Male, so gelingt es entweder gar nicht oder sehr selten, dieselben anaphylaktisch zu machen (siehe Tabelle I).

1) Folia serolog., 1909; Tagung der Fr. Vereinigung f. Mikrob., 1909.

Tabelle I.

Meer- schw.	Vorbehandelt mit	Intravenös injiziert am	Erscheinungen
Versuch I. Tiere mit Typhuskulturen vorbehandelt.			
818	Kontrolltier	6. III. 1 ccm einer Typhusagarfl. in $\frac{1}{10}$ Norm.-Sodalös.	—
929	dgl.	6. III. dgl.	—
905	Einmal — 10. II. — 1 ccm Typhusaufschwemm. (Agarflasche + 90 NaCl)	6. III. dgl.	—
553	10. II. dgl.	6. III. dgl.	—
126	10. II. dgl.	10. III. dgl.	—
535	10. II. dgl.	10. III. dgl.	—
Versuch II. Tiere mit Typhus vorbehandelt.			
81	Kontrolltier	16. III. 1 ccm Typhusagarfl. in 10 ccm $\frac{1}{10}$ Norm.-Sodalösung	—
82	16. II. u. 19. II. $\frac{1}{10}$ Oese Typhuskultur	16. III. dgl.	—
933	dgl.	16. III. dgl.	—
902	dgl.	22. III. dgl.	Krank, keine Krämpfe
707	dgl.	22. III. dgl.	Keine Krämpfe, krank
Versuch III. Tiere mit Typhus vorbehandelt.			
526	10. II. und 19. II. $\frac{1}{2}$ Oese Typhuskultur	22. III. 1 ccm einer Agarfl. in 10 ccm $\frac{1}{10}$ Norm.-Sodalös.	Nach 5' Krämpfe, vorübergehend, erholt sich wieder ein wenig, keine Krämpfe, doch krank
884	dgl.	dgl.	Nach 2' starke Krämpfe, Dyspnoë, erholt sich ein wenig, keine Krämpfe, doch krank
Versuch IV. Tiere mit Typhus vorbehandelt.			
40	10. II. $\frac{1}{500}$ } Oese 16. II. $\frac{1}{400}$ } Typhus- 19. II. $\frac{1}{50}$ } kultur	16. III. 1 ccm einer Typhusagarflasche in 10 ccm $\frac{1}{10}$ Norm.-Sodalösung	—
14	dgl.	16. III. 2 ccm dgl.	—
73	dgl.	22. III. dgl.	—
826	dgl.	22. III. 1 ccm dgl.	—
599	10. II. } $\frac{1}{100}$ Oese 16. II. } Typhus- 19. II. } kultur	16. III. dgl.	—
894	dgl.	16. III. dgl.	—
57	dgl.	22. III. dgl.	—
720	dgl.	22. III. dgl.	Nach 10' krank, keine Krämpfe

Am besten reussiert man, wenn man je  $\frac{1}{100}$  Oese auf  $70^{\circ}$  C erhitzter Bakterienaufschwemmung durch zehn Tage hintereinander subkutan injiziert. Zur Auslösung des anaphylaktischen Shocks müssen 1—2 ccm einer Aufschwemmung von einer Flasche Kultur in 10—15 ccm  $\frac{1}{10}$  Normal-Sodalösung verwendet werden.

Die Reinjektion wird intravenös in die Vena jugularis gemacht. Bei einzelnen Tieren läßt sich auf diese Weise schon etwa 14 Tage nach der letzten Injektion Anaphylaxie nachweisen, besser ist jedoch, wenn man etwa 3 Wochen wartet, wie schon Kraus und Doerr angeben.

Von anderer Seite wurde eingewendet, daß zwar Bakterienanaphylaxie zu erzeugen sei, aber dieselbe sei nicht spezifisch.

Delanoë<sup>1)</sup> hat gesehen, daß Meerschweinchen, die er mit einer peritonealen Injektion von *Bacillus tuberculosis* homog. sensibilisiert hatte, an Anaphylaxie zugrunde gingen, wenn man ihnen eine genügende Menge Bakterienaufschwemmung von *Bacillus typhi*, coli, Paratyphus A, Paratyphus B oder auch Pferdeserum injizierte.

Andererseits zeigten die Meerschweinchen, die durch eine intravenöse Injektion von *Bacillus Eberth* sensibilisiert wurden, nach 14 Tagen eher eine Ueberempfindlichkeit gegen den *Bacillus tuberculosis* homog. als gegen den *Bacillus Eberth*.

Aus diesen Versuchen zieht Delanoë den Schluß, daß die Anaphylaxie nicht spezifisch ist. Allerdings gibt Delanoë in einer anderen Arbeit an, daß die stärkste Reaktion mit dem zugehörigen *Bacillus* hervorzurufen wäre.

Diese Ergebnisse stehen in direktem Widerspruch mit denen von Kraus und Doerr. Denn diese teilen mit, daß mit Typhusbacillus vorbehandelte Tiere nur auf Reinjektion von Typhus reagierten, während Choleraextrakte, ja sogar Paratyphusextrakte keine charakteristischen Erscheinungen hervorriefen.

Ebensowenig reagierten Cholera-tiere auf Nasikextrakt oder umgekehrt Nasik-tiere auf Choleravibrionenextrakt. Wenn auch in den meisten Fällen der Anaphylaxieversuch zur Iden-

---

1) Montpellier 1909.



tifizierung von Bakterien im Vergleich zu anderen verlässlichen Methoden viel umständlicher ist und daher derzeit nicht verwendet wird, so handelte es sich doch um eine prinzipielle Frage, die einer Klärung bedurfte. Die diesbezüglichen Ergebnisse finden sich in der nachfolgenden Tabelle (siehe Tabelle II).

Tabelle II.

Meer-schw.	Vorbehandelt mit	Injiziert intravenös	Erscheinungen
Weißgelb	Kontrolltier	21. VII. 1 ccm Coliaufschwemm. (Agarfl. in 15 ccm $\frac{1}{10}$ N.-Sodalösg.)	Keine
Gelb	dgl.	21. VII. 2 ccm Coliaufschwemm.	Leicht krank, leichte Krämpfe
Weiß	Mit $\frac{1}{100}$ Oese Colikultur vom 17. VI. bis 27. VI.	21. VII. 1 ccm Coliaufschwemm.	Nach 2' schwer krank; Respirationskrämpfe, unkoordinierte Bewegungen, läßt Stuhl u. Urin unter sich, erholt sich nach 15'; nach $\frac{1}{2}$ h schwere Streckkrämpfe. Exitus .
Schwarzgelb	dgl.	21. VII. dgl.	Nach 3' leichte Krämpfe; krank
Schwarzgelb schwarze Ohren	dgl.	21. VII. 2 ccm Coliaufschwemm.	Nach 3' schw. Streckkrämpfe; Tier schwer krank; für einige Minuten erholt es sich etwas, dann wiederum krank. Exitus

Tabelle III.

Meer-schw.	Vorbehandelt mit	Injiziert intravenös	Erscheinungen
15	Vom 1. IV. bis 10. IV. je $\frac{1}{100}$ Oese Typhuskultur; 12. IV. $\frac{1}{2}$ Oese	2. V. 1 ccm Typhus-extrakt	Nach 3' schwere anaphyl. Erscheinungen, nach 4' Exitus
101	dgl.	2. V. dgl.	Sofort Erscheinungen. Exitus
142	dgl.	2. V. $\frac{1}{2}$ ccm Typhus-extrakt	Nach 4' krank, keine Krämpfe
156	dgl.	2. V. 1 ccm Coli-extrakt	Sofort Erscheinungen. Exitus
193	Kontrolltier	—	Keine
57	dgl.	—	Keine
907	dgl.	—	Keine

Mear- schw.	Vorbehandelt mit	Injiziert intravenös	Erscheinungen
560	Normales Tier	15. VII. 1 ccm Choleravibrionaufschw. (1 Agarfl. in 15 ccm $\frac{1}{10}$ Norm.-Sodalös.)	Keine
585	dgl.	15. VII. 0,5 ccm dgl.	Keine
584	Mit $\frac{1}{100}$ Oese Cholerakultur vom 17. VI. bis 27. VI.	15. VII. 1 ccm dgl.	Nach 3' Krämpfe, Dyspnoë; schwer krank; nach 6' tot
558	dgl.	15. VII. $\frac{1}{2}$ ccm Cholera	Nach 8' krank; keine Krämpfe
592	dgl.	15. VII. 1 ccm Typhusaufschwemm. (Agarfl. in 15 ccm $\frac{1}{10}$ Norm.-Sodalös.)	Keine
575	Kontrolltier	15. VII. $\frac{1}{2}$ ccm Typhusaufschwemm. (Agarfl. in 15 ccm Normal-Sodalös.)	Keine
564	dgl.	15. VII. 1 ccm Typhusaufschwemm.	Keine
576	$\frac{1}{100}$ Oese Typhuskultur vom 17. VI. bis 27. VI.	15. VII. $\frac{1}{2}$ ccm dgl.	Nach 6' schwer krank; keine Krämpfe
582	dgl.	15. VII. 1 ccm dgl.	Nach 5' typische anaphylakt. Erschein., nach 10' tot
565	dgl.	15. VII. 1 ccm Choleraaufschwemm.	Keine
606	dgl.	21. VII. 1 ccm Coliaufschwemmung	Keine
427	dgl.	21. VII. 1 ccm dgl.	Keine
27	Kontrolltier	2. V. 1 ccm Coliaufschwemmung	Keine
	Vom 1. IV. bis 10. IV. je $\frac{1}{100}$ Oese Colikultur, am 12. IV. $\frac{1}{2}$ Oese	2. V. 1 ccm dgl.	Krank; nach 3 <sup>h</sup> Exitus
	dgl.	2. V. 1,5 ccm dgl.	Sofort Exitus ohne Erschein.
	dgl.	3. V. 1 ccm Typhusaufschwemmung	Nach 5' anaphyl. Erschein.

Meer- schw.	Vorbehandelt mit	Injiziert intravenös	Erscheinungen
611	17. VI. bis 27. VI. je $\frac{1}{100}$ Oese Cholera-vibrionenkultur	30. VII. 1 ccm V.-Finkler - Aufschw. und 8' später Chol.-Pfeiffer - Aufschw. 1 ccm	Nach der I. Injektion keine Erschein.; nach der II. nach 2' leichte Krämpfe; Tier schwer krank
414	dgl.	30. VII. dgl.	Nach der I. Injektion keine Erschein.; nach der II. nach 4' Krämpfe; Tier schwer krank
430	dgl.	30. VII. 1 ccm Chol.-Pfeiffer-Aufschw.	Nach 4' Streckkrämpfe; Tier schwer krank

Aus derselben ersehen wir, daß Typhustiere konstant und prompt auf intravenöse Reinjektion von Typhusextrakt, Cholera-tiere auf Choleraextrakt, Colitiere auf Coliextrakt reagieren.

Als Zeichen der anaphylaktischen Reaktion sehen wir nur jene an, bei der nach einem kurzen Inkubationsstadium klonische Krämpfe der verwendeten Meerschweinchen auftreten, unter denen die Tiere entweder rasch zugrunde gehen, oder aber sich vollkommen erholen können. Diese klinischen Erscheinungen allein genügen jedoch nicht zur Charakterisierung der Anaphylaxie; von prinzipieller ausschlaggebender Bedeutung ist es, daß die letzteren Tiere bei einer zweiten Reinjektion sich als antianaphylaktisch erweisen. Das ist auch deshalb sehr wichtig, da mehr oder minder auch fast alle Kontrolltiere auf intravenöse Injektion so großer Mengen von Bakterienextrakten nach wenigen Stunden schwer erkranken und zugrunde gehen.

Es ist daher bei Meerschweinchen unbedingt die Erscheinung der Antianaphylaxie von wesentlicher Bedeutung.

Nun sehen wir aber, daß tatsächlich unter Umständen Colitiere auf Injektion von Typhusextrakt mit Symptomen der Anaphylaxie erkranken<sup>1)</sup>.

Injiziert man dagegen Cholera-tieren einen Extrakt von *Vibrio Finkler-Prior*, so kann es zwar geschehen, daß die

1) Weitere Versuche in dieser Richtung sollen entscheiden, ob nicht durch quantitative Arbeiten konstant strenge Spezifität nachweisbar ist.

Tiere bei Verwendung größerer Mengen krank werden, ohne jedoch die Symptome von Anaphylaxie zu zeigen.

Reinjiziert man nach ca. 15 Min. durch die Vena jugularis 1 ccm eines Choleraextraktes, so treten nach wenigen Minuten die typischen klonischen Krämpfe des anaphylaktischen Shocks auf.

Aus diesen Versuchsergebnissen sind wir wohl berechtigt, den Schluß auf eine Spezifität der Bakterienanaphylaxie zu ziehen.

Der Coli-Typhusversuch spricht nicht dagegen, da es ja bekannt ist, daß die Immunitätsreaktionen, zu denen auch die Bakterienanaphylaxie zu rechnen ist, quantitativ verlaufen.

Nimmt man nun an, daß im Typhusstamm und in einem ihm naheverwandten Colistamm ein Teil der Gruppen identisch ist, was um so eher erlaubt ist, als wir ja ähnliche Verhältnisse auch bei der streng spezifischen Agglutination anzunehmen gezwungen sind, dann sind solche scheinbare Ausnahmen von der Spezifität der Bakterienanaphylaxie leicht erklärlich.

Der Tuberkuloseversuch von Delanoë läßt sich auf diese Weise allerdings nicht erklären.

Es fragt sich jedoch, ob es sich in diesem Falle nicht um eine reine Toxinwirkung bei überempfindlichen Tieren handelt hat.

### Zusammenfassung.

1) Meerschweinchen lassen sich mit Bakterien derart vorbehandeln, daß sie, nach einer bestimmten Zeit reinjiziert, typische Symptome der Anaphylaxie darbieten. Die Vorbehandlung muß in einer bestimmten Weise geschehen.

2) Die Spezifität der Bakterienanaphylaxie muß aufrecht erhalten werden. Die manchmal konstatierte Reaktion der mit Typhusantigen vorbehandelten Tiere auf Coliantigen widerspricht nicht der Spezifität.

3) Die Versuche bestätigen die von Kraus und Doerr mitgeteilten Resultate über Bakterienanaphylaxie.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem staatlichen Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

## **Ueber Gifte der Typhusbacillen und über giftneutralisierende Eigenschaften des Immunserums.**

Von Prof. **R. Kraus** und Dr. **R. v. Stenitzer**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. September 1909.)

### **Einleitung.**

In Verfolgung der Frage, ob Bakterien, wie beispielsweise Choleravibrionen, Meningokokken, Dysenteriebacillen, Gifte mit antigenem Charakter bilden können, haben wir auch die Typhusbacillen (Paratyphusbacillen) in den Bereich systematischer Untersuchung gezogen. Ueber diese Untersuchungen wurde von uns bereits kurz berichtet (Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 2, 25), und der Stand der Frage im Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung skizziert.

Im folgenden soll über unsere fortgesetzten Versuche über Gifte der Typhusbacillen sowie über ihre Neutralisierbarkeit mittels Immunserums in extenso berichtet werden. Anschließend an diese experimentellen Untersuchungen haben wir gleichzeitig auch von der bisherigen Anwendung unserer Typhusimmunsera an Menschen bei epidemisch auftretendem Typhus berichtet (Wiener klin. Wochenschr., 1909).

### **I. Ueber Gifte der Typhusbacillen.**

Das Studium der Typhusgifte ist in den letzten Jahren durch R. Pfeiffer wieder aktuell geworden. Pfeiffer hat in Fortsetzung seiner bekannten Studien über Choleragifte sich auch mit Typhusgiften beschäftigt und nimmt diesbezüglich den gleichen Standpunkt ein wie für die Gifte der Choleravibrionen.

Pfeiffer nimmt, wie bekannt, an, daß so wie die Cholera auch der Typhus eine Vergiftung darstellt, hervorgerufen durch Giftstoffe der Typhusbacillen, welche durch Auflösung der Bakterienleiber frei werden. Diese Gifte nennt Pfeiffer

Endotoxine, wenn auch eine Immunisierung mit diesen Giften ihm nicht gelungen ist.

Ein ganz besonderes Interesse gewannen diese Typhusgifte durch die Untersuchungen von Besredka. Derselbe erhielt durch eine eigene, unten näher ausgeführte Methode aus Typhusbacillen ein Gift (Endotoxin), welches einerseits ausgesprochene giftige Eigenschaften für die Versuchstiere aufwies und anderseits durch auf immunisatorischem Wege dargestelltes Immunserum von Pferden neutralisiert werden konnte. Zu gleichen Resultaten führten auch seine Untersuchungen über die intracellulären Gifte der Pest- und Dysenteriebacillen. Diese Befunde Besredkas haben durch die Arbeiten Macfadyens und Rowlands eine weitere Bestätigung gefunden.

Auch durch unsere Untersuchungen, welche, wie gesagt, einen Teil der systematischen Studien über Endotoxine im allgemeinen ausmachen, sind die antigenen Eigenschaften der Typhusgifte als sichergestellt anzunehmen.

Was die Darstellung von Typhusgiften anbetrifft, so wurden mannigfache Methoden von den Autoren in Anwendung gebracht.

Besredka stellte die Gifte in folgender Weise dar: Die Kochsalzaufschwemmung einer 16—18-stündigen Agarkultur wurde auf 1 Stunde bei 60° erhitzt und dann im Vakuum getrocknet (Endotoxin solid). Die Trockensubstanz wird mit Kochsalz in Substanz (zu 1 g Trockensubstanz 0,3—0,45 g NaCl) im Achatmörser fein verrieben, dann allmählich 1—2 ccm destilliertes Wasser zugefügt, die Aufschwemmung in eine Eprouvette umgegossen, noch weiter mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und 2 Stunden im Wasserbad von 60 bis 62° und weitere 10—12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Die Mikroben senken sich zu Boden, und die darüberstehende Flüssigkeit, welche transparent und opaleszierend erscheint, stellt die Endotoxinlösung dar. Eine Giftlösung erhielt er auch, wenn er die im Vakuum getrockneten Bacillen mit physiologischer NaCl-Lösung und Normalpferdeserum in folgendem Verhältnis mischte: 0,15 g Bacillen, 2 ccm physiologischer NaCl-Lösung, 8 ccm Pferdeserum. Die Bacillen,

welche Agglutination zeigen, werden nach 2 Stunden abzentrifugiert. Die so gewonnene Flüssigkeit stellt die Giftlösung dar. 1 g Trockensubstanz + 0,3 g Kochsalz + 30 ccm destilliertes Wasser hatte ungefähr folgende Wirkung: 1 ccm tötete peritoneal ein Meerschweinchen von 250 g; 1,0—1,5 ccm tötete intravenös oder peritoneal injizierte Kaninchen von 1800 g. Die Giftlösung war toxisch für Pferd, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Maus.

Unter Nutzanwendung des Buchner-Hahnschen Prinzips der Plasmingewinnung gelangte Macfadyen ebenfalls zu positiven Resultaten. Er verwendete direkt aus der Bauchhöhle von Meerschweinchen isolierte Typhusbacillen, die er in Roux-Flaschen 18 Stunden züchtete; die Kulturen wurden mit Wasser abgewaschen,  $\frac{1}{2}$  Stunde zentrifugiert und das erhaltene Sediment in einem eigens konstruierten Apparat in gefrorenem Zustande zerrieben. Das Produkt wurde mit 1 ‰ Kalilauge aufgenommen, 2 Stunden zentrifugiert und abpipettiert. Dieser Zellsaft, dem noch die nicht zentrifugablen Bakterien beige-mengt sind, wurde noch durch  $\frac{1}{2}$  Stunde mit Chloroformdampf behandelt. Das so gewonnene, allerdings sehr labile Produkt war steril und toxisch für Ziegen und Kaninchen.

Mittels Autolyse arbeiteten Conradi, Brieger und Mayer, Wassermann, Shiga und Neisser, Shiga und Lipstein, Hahn.

Die besten Resultate erzielte Conradi sowie Hahn. Conradi nahm 20-stündige Agarkulturen (3-proz. Fleischwasseragar mit Zusatz von 1 Proz. Tropon), kratzte sie behutsam ab und versetzte sie mit 0,85-proz. steriler Kochsalzlösung; dann wurde die Aufschwemmung 24—48 Stunden bei 37,5° der Autolyse überlassen. Die sich bildende obere Schicht wurde abpipettiert, mit der 5-fachen Menge 0,85-proz. NaCl-Lösung verdünnt und durch Berkefeldfilter filtriert. Das Filtrat wurde dann bei 35° eingedampft ( $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{50}$  seines ursprünglichen Volumens). Für 300 g Meerschweinchen genügte 0,2 ccm dieses eingeeengten Filtrates, um das Tier binnen 24 Stunden zu töten. Immunisierungen mit diesem Gifte wurden von Conradi nicht vorgenommen.

Hahn spülte die auf Agar-Kolle-Schalen gezüchteten Typhusbakterien mit Dünndarmpreßsaft ab. Den Darmpreßsaft

stellte er folgendermaßen dar: Frische, normale menschliche Dünndarmstücke wurden zunächst gut mit Wasser gereinigt, dann in einer Fleischhackmaschine abgepreßt, mit Sand und Kieselgur nach Buchner-Hahn verrieben und unter der hydraulischen Presse neuerlich ausgepreßt. Die beiden gewonnenen Preßsäfte vereinigt, durch Schüttelung mit Chloroform entfettet, dann im Eisschrank absitzen gelassen und durch Berkefeldfilter geschickt. Wenn er nun mit diesem Preßsaft die Agarkulturen abspülte, das Produkt bei 36—37° in wechselnden Zeiträumen digerierte, die überstehende Flüssigkeit abheberte und steril (Berkefeld) filtrierte, so gewann er verschieden wirksame Giftlösungen, die auf Meerschweinchen von 200 g in Mengen von 0,6 ccm innerhalb 12—20 Stunden tödlich wirkten.

Während die eben beschriebenen Methoden mittels Extraktion oder Auspressung Gifte aus Typhusbacillen zu gewinnen suchen, bemühte man sich, auch aus Bouillonkulturen nach Analogie der Giftgewinnung bei der Diphtherie Gifte darzustellen (Bäumer und Peiper, Pfeiffer und Kolle).

Während die letzteren Autoren in Kulturfiltraten nur Andeutung von Giftwirkung erzielten, berichtet Chantemesse, daß er aus Bouillonkulturen, denen er ein Mazerat von frischer Leber, Knochenmark und eine geringe Menge defibriniertes Menschenblut zusetzte, nach 5—6-tägiger Kultivierung giftige Filtrate gewann. Ebenso gelangte er zu positiven Resultaten mit Peptonlösungen. Die Peptonlösung stellte er sich durch Pepsinverdünnung aus Milz dar. Auch die antigene Natur dieser Giftlösungen wurde von Chantemesse nachgewiesen.

Weiter hat Moreschi von Giftwirkung aus 5—6-tägigen Kulturfiltraten Mitteilung gemacht. Er verwendete folgende Bouillon: 1 kg Pferdefleisch, 1 kg Ochsenfleisch, 1000 Wasser, 24 Stunden Zimmertemperatur, dann gekocht und filtriert. Nach Zusatz von 2 Proz. Wittepepton, 1 Proz. Plasmon, 0,5 Proz. Kochsalz, 8 Proz. Ochsenblut, wurde 20 Minuten im Autoklaven gekocht, dann mit NaOH im Verhältnis von 0,15 Proz. alkalisiert, abermals im Autoklaven gekocht und filtriert. Immunisierungsversuche wurden von ihm nicht angestellt.

Aronson benützte Filtrate von 4—10-tägigen Bouillonkulturen. Er konnte das Gift durch Ammonsulfat völlig aus-



fällen. Durch Auflösen des Niederschlages, mehrtägiges Dialysieren in Schweinsblasen und Eindampfen der Lösung im Vakuum konnte er wirksame feste Gifte darstellen. 0,05 g genügte, um ein Kaninchen akut zu töten. Noch bessere Resultate erzielte er, wenn er Bacillenleiber, mit Bouillon gewaschen, über  $\text{H}_2\text{SO}_4$  trocknete, im Achatmörser zerrieb, mehrere Stunden im Brutschrank mit  $\frac{1}{20}$  Proz. Aethylendiaminlösung schüttelte und die Masse dann filtrierte. Da die Lösung stark eiweißhaltig war, entfernte er einen Teil des unwirksamen Eiweißes durch Neutralisieren mit verdünnter Essigsäure, filtrierte neuerlich, dialysierte 1 Tag gegen Wasser und dampfte im Vakuum ein. Von diesem festen Gift genügten 0,01—0,024 g, um ein Kaninchen akut zu töten (s. Pick, Handb. f. Immunitätsforschung, Bd. 1, p. 370).

In jüngster Zeit sind ausführliche Versuche über Giftbildung der Typhusbacillen und ihre immunisierende Wirkung von Gottstein und Matthes mitgeteilt worden. Sie untersuchten, inwieweit die Produkte, welche sie durch Pepsin- und Trypsinverdauung aus Typhusbakterien erhielten, giftig wären. Die Darstellungsweise war folgende: 18-stündige Agarkulturen in Kolleschalen wurden in destilliertem Wasser (50—60 ccm pro Kolben) aufgeschwemmt. 18—20 Stunden mit Chloroform behandelt, dann mit konzentrierter Salzsäure bis zur Konzentration von 0,25—0,4 Proz. angesäuert, 1,5—2,0 g Pepsin. sicc. solubile Merk oder frisches Schweinemagenpepsin zugesetzt und in den Brutschrank gestellt. Nach 3—4-tägiger Verdauung, wobei nach 6—8 Stunden, eventuell auch nach 24 Stunden, neuerdings 0,5—1,0 g Pepsin zugesetzt worden war, wurde zentrifugiert, durch Berkefeldfilter filtriert, mit 3-proz. Sodalösung neutralisiert, bis die Reaktion auf freie Salzsäure gegen Kongopapier verschwand, Lackmuspapier aber noch Rotfärbung zeigte, dann bei  $37^\circ$  im Vakuum eingedampft, die resultierende Masse in 0,5-proz. Karbollösung aufgelöst. Zur Giftprüfung wurden 3—6-proz. Lösungen verwendet. Dieses von Gottstein „Fermotoxin“ genannte keimfreie Präparat zeigte Giftwirkung auf Meerschweinchen, Kaninchen und besonders Ziegen. Ebenso giftig erwies sich der vom Pepsin nicht verdaute Teil der Bacillen (Pepsinverdauungsrest), der nach Neutralisation und sorgfältigem Auswaschen im Vakuum (nicht über  $40^\circ$ ) getrocknet und dann in sterilem

Wasser aufgeschwemmt wurde. In weiterer Verfolgung ihrer Verdauungsversuche konnten sie auch durch tryptische Verdauung eine Giftlösung gewinnen. Die Typhusagarkulturen wurden in analoger Weise mit einem Ueberschuß von sterilem Wasser aufgeschwemmt, mit Chloroform behandelt, nach 24 Stunden schwach mit Soda alkalisiert, 2 g Tryps. sicc. Merk und nach 4-stündiger Verdauung nochmals 1 g Trypsin zugesetzt. Nach 9-stündiger Verdauung wurde zentrifugiert, keimfrei filtriert und im Vakuum bei niedriger Temperatur eingedampft. Die Trockensubstanz in 0,5-proz. Karbollsäure aufgelöst und zur Injektion verwendet. Diese Befunde mit Pepsinsalzsäuredigestion von Typhusbacillen fanden eine weitere Bestätigung und Nutzenanwendung durch L ü d k e.

Bevor wir auf unsere zahlreichen Versuche übergehen, sei noch hervorgehoben, daß die Versuche von Lange, welche durch Bail eine Bestätigung erfahren haben, eine Giftbildung auch im Tierkörper nachweisen. Lange zeigt, daß bakterienfreie Exsudate (Filtrate) von peritoneal infizierten Meerschweinchen in Dosen von 0,5–2,0 ccm Meerschweinchen binnen 18–24 Stunden töten. Lange nimmt auf Grund dieser Befunde an, daß Typhusbacillen im Organismus Toxin produzieren, wodurch die Giftigkeit der keimfrei filtrierten Exsudate ihre Erklärung finden würde.

Unsere ersten Versuche beschäftigten sich mit der Frage, ob überhaupt in Bouillonkulturen Gift gebildet wird und in welcher Abhängigkeit die Produktion von dem Alkaleszenzgrad und dem Alter der Kultur steht. Wir verwendeten eine Fleischbouillon von fettfreiem Rindfleisch mit einem Zusatz von  $1\frac{1}{2}$  Proz. Wittepepton und  $\frac{1}{2}$  Proz. Kochsalz. In Tabelle I sind die verschiedenen Variationen des Alkaleszenzgrades ersichtlich. Die Bouillon wurde mit 24-stündigen Agarkulturbacillen beschickt und nach verschiedenen Zeitintervallen karbolisiert (5 Proz.) und nach 24 Stunden durch Papier klar filtriert. Die anfangs verwendeten Reichefilter erwiesen sich wegen ihrer Eigenschaft, große Mengen Gift zurückzuhalten, als unbrauchbar. Es hatte sich alsbald gezeigt, daß die verwendeten Typhusstämme sehr verschieden toxisch seien, eine Tatsache, die ja bei Diphtheriebacillen, Dysenteriebacillen, Choleravibrionen längst bekannt ist. Wir

Tabelle I.

Alter der Kultur nach Tagen	Diphtherie- bouillon	Dysenteriebouillon	Bouillon 2,4	Bouillon 5	Bouillon Lackm. neutr.	Bouillon vom Lackmuspkt. 12 cem 1% NaOH	Bouillon vom Lackmuspkt. 15 cem 1% NaOH	Bouillon 2,4 + Ascites ää	Dysenteriebouillon + Ascites ää
9	VI <sub>3,0</sub> XII <sub>1,0</sub>		XIII <sub>0,5</sub> XI <sub>0,5</sub>						
11	VI <sub>1,0</sub> Sprung <sub>2,0</sub>		II <sub>3,0</sub> VI <sub>3,0</sub>						
12	VI <sub>1,5</sub>				II <sub>3,0</sub>	XIII <sub>1,0</sub>	XIII <sub>3,0</sub>		
13	VI <sub>3,0</sub>	VI <sub>3,0</sub>							
14	VI <sub>1,0</sub> XIII <sub>1,0</sub>	Galle <sub>1,5</sub>						Galle <sub>3,0</sub> XIII <sub>2,0</sub>	VI <sub>3,0</sub>
16			XIII <sub>2,0</sub> XI <sub>3,0</sub>	VI <sub>3,0</sub> V <sub>3,0</sub> XX <sub>3,0</sub>					
18	XIII <sub>2,0</sub>	XIII <sub>2,0</sub> XI <sub>1,0</sub>	XVII <sub>3,0</sub> XX <sub>3,0</sub> VI <sub>3,0</sub> III <sub>3,0</sub>						
23	VI <sub>3,0</sub>		XIII <sub>2,0</sub> XI <sub>3,0</sub> VI <sub>3,0</sub>						
24		XIII <sub>1,0</sub>							
25			V <sub>3,0</sub>						
40		XIII <sub>3,0</sub>							

## Anmerkung:

Diphtheriebouillon: Vom Lackmusneutralpunkt 10 cem Normal-Sodalösung auf 1 Liter.

Dysenteriebouillon: Vom Lackmusneutralpunkt 3 g krist. Soda auf 1 Liter.

Bouillon 2:4: Vom Phenolphthaleinpunkt 2,4 cem 5-proz. NaOH auf 1 Liter.

Bouillon 5: Vom Phenolphthaleinpunkt 5 cem 5-proz. NaOH auf 1 Liter.

VI<sub>1,5</sub> usw. bedeutet: Ty-Stamm VI tötet intravenös in einer Dosis von 1,5 cem ein Kaninchen von 8—900 g binnen 4—24 Stunden.

fanden damals unter 20 Stämmen, von denen allerdings die meisten schon längere Zeit im Laboratorium fortgezüchtet worden waren, 9 Stämme, welche Toxin bildeten. Ob der Alkaleszenzgrad der Bouillon für die Toxinbildung von wesentlicher Bedeutung ist, ließ sich nicht definitiv entscheiden. Am geeignetsten fanden wir Bouillon 2,4. Die Filtrate derselben lieferten nach 9-tägiger Kultivierung mit Stamm XIII und XI eine Giftlösung, welche in Mengen von 0,5 cem ein Kaninchen von ca. 800 g binnen 24 Stunden nach intravenöser Injektion töteten. Die Ausbeute an Gift war mithin keine erheblich geringere, als sie bei Cholera und Dysenterie zu erzielen ist. Wir wählten auf Grund vieler Versuche die intravenöse Injektion,

da bei peritonealer und noch mehr bei subkutaner Applikation die letalen Dosen weit höher bemessen werden mußten und außerdem die Resultate sich als schwankend erwiesen. Ueberhaupt machen sich die individuellen Resistenzschwankungen sowohl bei Kaninchen als auch insbesondere bei Meerschweinchen, die unseren Bouillongiften gegenüber wenig empfänglich sind, geltend. Wir experimentierten in der Folge daher fast durchweg an Kaninchen mittels intravenöser Injektion. Verschiedene Modifikationen der Züchtung in Bouillon, die wir vorgenommen haben, ergaben keinerlei wirksamere Giftfiltrate. So versuchten wir insofern den Einfluß der atmosphärischen Luft möglichst einzuschränken, indem wir Bouillon mit Vaselineöl überschichteten und dann impften. Die Kultur wurde bei 37° infolge des mäßigen Wachstums durch verschiedene Zeit fortgesetzt (auch bis zu 3 Monaten), dann auf Reinheit geprüft, karbolisiert und durch Papier filtriert. Die Ausbeute an Gift betrug 2—3 ccm pro Kaninchen.

Weiter versuchten wir die Züchtung in Bouillon mit Zusatz von frischer Kaninchenleberzerreibung. Auf 50 ccm Bouillon wurden 2 g Leber fein verrieben zugesetzt, dann im strömenden Wasserdampf sterilisiert, 10 Tage bebrütet, karbolisiert und durch Papier filtriert. Vom Stamm XIII, Sprung, erhielten wir so Filtrate, welche in Mengen von 2 ccm Kaninchen (intravenös) und Mäuse (peritoneal) in Mengen von 0,5 ccm töteten. In ähnlicher Weise verfahren auch Chantemesse, Tarozzi und Vrzošek.

Immerhin erwiesen sich unsere Bouillongifte als echte spezifische Toxine, da sie, worauf wir noch zurückkommen werden, auf immunisatorischem Wege Antitoxin auszulösen imstande waren.

Viel sicherere und gleichmäßigere Resultate in der Giftgewinnung haben wir jedoch mittels der Extraktion aus Agarkulturen erzielt. Wir verwendeten dazu Kochsalzlösung, Soda-lösung oder Pottasche. Eine Autolyse im Sinne Conradis erscheint uns nach unseren Resultaten für die Giftgewinnung gar nicht notwendig. Wir verweisen hier auf ähnliche Resultate bei der Giftgewinnung aus Cholera-Meningokokken. So konnte bereits durch kürzere Extraktion mit Kochsalz, wie Tabelle II zeigt, eine Giftlösung gewonnen werden, welche

Tabelle II.

24-stündige Agarkultur (Kolleschale) mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung ab gespült, karbolisiert und nach 24 Stunden durch Papier filtriert.

Datum	Stamm	Menge ccm	Tierart	Art der Ein- verleibung	Resultat
1. II. 07	Sprung	1,0	Kaninchen	intravenös	† nach 6 Std.
1. V. 07	"	1,0	"	"	† nach 4 Std.
31. I. 08	"	1,0	"	"	† nach (?)
31. I. 08	"	0,5	Maus	peritoneal	† nach 12 St.
31. I. 08	"	0,1	"	"	ø
1. II. 07	XIII	1,0	Kaninchen	intravenös	† nach 6 Std.
1. V. 07	"	1,0	"	"	† nach 4 Std.
26. VII. 07	"	1,0	"	"	† nach 12 St.
31. I. 08	"	1,0	"	"	† nach (?)
31. I. 08	"	1,0	Maus	peritoneal	† nach 12 St.
31. I. 08	"	0,5	"	"	ø

in Mengen von 1 ccm Kaninchen intravenös und Mäuse in Mengen von 0,5 ccm intraperitoneal binnen mehreren Stunden tötete. Die Resultate der Extraktion an einigen Typhusstämmen mittels Sodalösung und Pottasche, welche Lösungen wir in der Folge zur Giftbereitung, Immunisierung und Prüfung auf den Antitoxingehalt der Sera verwendeten, sind aus den Tabellen III und IV ersichtlich. Diese Extrakte erwiesen sich auch auf Mäuse wirksam.

Tabelle III.

24-stündige Agarkultur (Kolleflasche) wird mit 10 ccm  $\frac{1}{10}$  normaler Sodalösung ab gespült, karbolisiert, 24 Stunden in der Kühlkammer stehen gelassen, durch Papier filtriert.

Datum	Stamm	Menge ccm	Tierart	Art der Ein- verleibung	Resultat
12. XI. 07	XIII	2,0	Kaninchen	intravenös	†
19. IX. 08	"	0,5	"	"	†
19. IX. 08	"	0,1	Maus	intraperiton.	†
28. IX. 08	"	0,5	Kaninchen	intravenös	†
29. IX. 08	Konradi 8	0,1	Maus	intraperiton.	†
28. X. 08	"	0,5	Kaninchen	intravenös	†
16. XI. 08	"	0,5	"	"	†
28. IX. 08	Konradi 2	0,5	Kaninchen	intravenös	†
28. IX. 08	"	0,1	Maus	intraperiton.	†
16. XI. 08	Konradi 7	0,5	Kaninchen	intravenös	†
30. XI. 07	Sprung	2,0	Kaninchen	intravenös	†
30. XI. 07	"	0,25	Maus	intraperiton.	†
30. XI. 07	VI	2,0	Kaninchen	intravenös	ø

Tabelle IV.

24-stündige Agarkultur (Kolleflasche) wird mit 10 ccm Kochsalzlösung, der 0,25 ccm Normallösung von  $K_2CO_3$  zugesetzt worden war, aufgeschwemmt, karbolisiert und nach 24 Stunden durch Papier filtriert.

Datum	Stamm	Menge ccm	Tierart	Art der Ein- verleibung	Resultat
16. VI. 07	Sprung	1,0	Kaninchen	intravenös	+ 4 Std.
16. VI. 07	"	0,5	Maus	intraperiton.	+ } nach
16. VI. 07	"	0,3	"	"	+ } einigen
16. VI. 07	"	0,1	"	"	+ } Stunden
16. VI. 07	XIII	1,0	Kaninchen	intravenös	+ 4 Std.
16. VI. 07	"	0,5	Maus	intraperiton.	+ } nach
16. VI. 07	"	0,3	"	"	+ } einigen
16. VI. 07	"	0,1	"	"	+ } Stunden

Unsere daraufhin gerichteten Versuche ließen uns nicht die Ueberzeugung gewinnen, daß das Eindampfen der Extrakte im Vakuum oder die Fällung derselben mit Alkohol besondere Vorteile biete. (Siehe Tabellen V, VI, VII.)

Tabelle V.

24-stündige Agarkultur wird mit 25 ccm destilliertem Wasser abgespült, im Schüttelkolben mehrere Stunden geschüttelt, im Vakuum bei 35–40° C eingedampft und im Exsikkator getrocknet. Das trockene Pulver wird in Kochsalzlösung aufgelöst, so daß eine 5-proz. Lösung resultiert, karbolisiert und durch Papier filtriert.

Datum	Stamm	Menge ccm	Tierart	Art der Ein- verleibung	Resultat
27. XI. 06	XI	1,0	Kaninchen	intravenös	+ 1 Tag
27. XI. 06	"	0,5	"	"	0
27. XI. 06	VI	1,0	"	"	+
27. XI. 06	"	0,5	"	"	+

Tabelle VI.

24-stündige Agarkultur (Kolleflasche) wird mit 25 ccm Bouillon aufgeschwemmt, bei 37° in Petrischalen eingetrocknet; dann in (15 ccm) Kochsalzlösung aufgelöst, die stark trübe, opaleszierende Flüssigkeit toluolisiert und bei 12 Stunden geschüttelt, dann 12 Stunden stehen gelassen (bei Zimmertemperatur), das Toluol abfiltriert, die stark trübe Flüssigkeit scharf zentrifugiert, wodurch starke Klärung erzielt wird. Die überstehende Flüssigkeit injiziert.

Datum	Stamm	Menge ccm	Tierart	Art der Ein- verleibung	Resultat
21. III. 08	XIII	2,0	Kaninchen	intravenös	+ 12 Std.
21. III. 08	Galle	2,0	"	"	+ 3 Tage

Tabelle VII.

24-stündige Agarkultur (Kolleflasche) wird mit 10 ccm destilliertem Wasser abgespült, karbolisiert, 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, darauf mit 98-proz. Alkohol im Ueberschuß ausgefällt, möglichst rasch durch Papier filtriert, Filtrerrückstand bei 37° rasch getrocknet, abgetrocknet, abgeschabt, über Schwefelsäure scharf getrocknet, pulverisiert und in Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die Lösung ist keine vollkommene. Durch Zentrifugieren erhält man eine ziemlich klare Lösung. Trockenrückstand 1 Agarflasche, aufgelöst in 3 ccm Kochsalzlösung, ergab folgendes Resultat:

Datum	Stamm	Menge ccm	Tierart	Art der Ein- verleibung	Resultat
15. X. 07	Sprung	1,5	Kaninchen	intravenös	†
15. X. 07	"	1,0	"	"	†
15. X. 07	XIII	1,5	"	"	⊕
15. X. 07	"	1,0	"	"	⊕

Jedenfalls haben wir die besondere Labilität dieser Gifte zu berücksichtigen, die auch sämtlichen Autoren bei ihren Arbeiten als besonders störend aufgefallen ist. So hat Aronson sein Filtratgift durch Ammonsulfatfällung, wie oben bereits mitgeteilt wurde, in fester Form übergeführt, doch auch in dieser Form ist die Haltbarkeit, wie er angibt, eine beschränkte. Nichts Besseres können wir von dem durch alkoholische Fällung gewonnenen, im Exsikator über Schwefelsäure aufbewahrten Trockenpulver berichten. Bringt also die Trockendarstellung, soweit nach den bisherigen Erfahrungen hervorgeht, in betreff der Haltbarmachung der Gifte keinen wesentlichen Gewinn, so glauben wir auch noch, daß durch die dabei notwendigen umständlicheren Manipulationen, wie Eindampfen, Eintrocknen, Fällen, Wiederauflösen, Dialysieren etc., der erwartete Gewinn durch die erfolgte Konzentrierung der Giftlösung, wenn vielleicht auch nicht qualitativ, so doch quantitativ durch Verlust an wirksamer Substanz wieder wett gemacht werde. Es erschien uns bei unserer Giftbereitung folgendes Prinzip besonders wichtig: 1) die Verwendung von jungen Kulturen, d. h. solchen, die nicht allzulange im Laboratorium fortgezüchtet worden waren, und auf welchen Punkt wir gerade in letzter Zeit größeres Gewicht legen; 2) rasches Arbeiten bei kühler Temperatur (z. B. Filtrieren in der Kühlkammer); 3) sofortige Verwendung der Giftlösung und jedesmalige frische Bereitung derselben.

Aus der Labilität der Gifte ist es erklärlich, daß über die physikalisch-chemischen Eigenschaften derselben wenig bekannt ist. Chantemesse gibt an, daß 58° sein Gift nicht beeinflußte und erst das Erhitzen auf 100° dasselbe zerstörte. Besredka fand sein Endotoxin thermostabil, es wurde erst durch 15-stündiges Erhitzen auf 57° C zerstört und vertrug im Autoklaven eine Temperatur von 127° durch 1/2 Stunde hindurch. Auch Aronson äußert sich in diesem Sinne. Seine Giftlösung blieb, bei 80° durch 1 Stunde erhitzt, intakt und verlor auch nach 1 Stunde im strömenden Wasserdampf keineswegs seine völlige Wirksamkeit. Hingegen nahm es bei gewöhnlicher Temperatur oder auch im Eisschrank, besonders bei Toluolzusatz, rasch an Wirksamkeit ab. Ansäuern mit Acid. tartaric. machte, wie Chantemesse und neuerdings Doerr für Dysenterietoxine angegeben haben, das Typhus-toxin unwirksam, doch gelang ihm durch nachträgliche Neutralisation mit Soda eine Reaktivierung desselben.

Worauf nun die so allgemein anerkannte Labilität dieser Gifte eigentlich beruhen mag, ist jedenfalls noch klarzustellen. Der regelmäßige erhebliche Rückgang der Wertigkeit der Giftlösungen oft schon im Verlauf von wenigen Tagen war uns bei unseren Versuchen jedesmal begegnet, gleichgültig, ob wir die Lösungen im Dunkeln, im diffusen Licht, im Eisschrank oder bei Zimmertemperatur aufbewahrten.

Was die Toxikologie der Gifte anlangt, so können wir nur auf besonders darauf gerichtete Untersuchungen von Chantemesse verweisen. Derselbe fand sein Gift blutdruckherabsetzend<sup>1)</sup>, Zirkulation und Respiration beschleunigend beim Hund. Ebenso fand er eine muskellähmende Komponente.

Die pathogenen Eigenschaften der Toxine sind keineswegs als charakteristisch anzusehen, doch äußerte sich bei unseren Versuchen, und soweit Angaben darüber vorliegen (Brieger, Chantemesse, Sirotinin, Moreschi, Meyer und Bergell und anderen), die Vergiftung klinisch im Auftreten von reichlichen, gewöhnlich flüssigen Diarrhöen, weiter in zunehmender Mattigkeit, die alsbald in einen

1) Ueber blutdruckherabsetzende Wirkung der Bakteriengifte s. Arbeit von Biedl und Kraus, Centralbl. f. Bakteriöl., 1908. Bericht über die 3. Tagung der freien Vereinigung f. Mikrobiologie, 1909.



Lähmungszustand der Extremitäten, besonders der hinteren Extremitäten, übergeht. Der anatomische Befund ergibt gewöhnlich eine mehr oder weniger ausgesprochene Hyperämie der Organe, speziell auch des Darmes, welcher bei manchen Tieren, welche erst nach längerer Zeit der Vergiftung erlagen, auch kleine Hämorrhagien aufweist. Meier und Bergell konstatierten bei Tieren, welche sich vom ersten Shock erholt hatten und erst nach Tagen der Vergiftung unter den bekannten Lähmungserscheinungen erlegen waren, eingreifendere Veränderungen am Darm, welche in manchen Punkten, wie sie annehmen, an die menschliche Typhuserkrankung erinnern. So besonders Schwellung der Plaques, bis kleinfünfgroschen große Blutungen, Schwellung der Follikel und stark geschwollene Schleimhautflächen. Vergrößerung der Mesenterialdrüsen, parenchymatöse Entzündung der Nieren, Blutungen und Nekrosen im Lebergewebe, seröse, manchmal hämorrhagische Peritonitis, seröse Pericarditis, Hyperämie der Milz u. dgl.

Wir können uns nach unserer reichen Erfahrung nur dahin äußern, daß wir in diesem Befund, der auch uns zum Teil wenigstens geläufig ist, nichts eigentlich Charakteristisches erblicken können, sondern nur den Ausdruck einer Vergiftung erblicken, der in ganz analoger Weise bei Cholera und zum Teil auch Dysenterie zu beobachten ist. Was speziell den Follikelapparat des Kaninchendarmes anlangt, so kann man sich leicht davon überzeugen, wie häufig derselbe schon beim gesunden Tier sich in einem auffallendem Schwellungszustand befindet.

Die Empfänglichkeit der Tiere ist eine ganz erheblich verschiedene. Man staunt, wie geringe Dosen einerseits beim Pferd oder Ziege schwere Vergiftungssymptome auszulösen vermögen, während andererseits kleine Versuchstiere, wie Huhn oder Taube, sich refraktär verhalten.

An der Hand der Mitteilungen der Autoren und nach unseren Erfahrungen könnte man folgende Empfänglichkeitsskala aufstellen:

- sehr empfänglich: Pferd, Ziege, Schaf (intravenös)
- empfänglich: Kaninchen (intravenös)
- minder empfänglich: Hund, Meerschweinchen, Maus und Frosch (Chantemesse)
- sehr resistent: Huhn, Taube (Chantemesse).

## II. Zur Methodik der Immunisierung.

Durch die vorangehenden Mitteilungen ist es als sicher festgestellt, anzunehmen, daß man aus Typhusbacillen lösliche Produkte gewinnen kann, welche namentlich bei intravenöser Injektion für verschiedene Tiere sich als giftig erweisen. Diese Gifte, welche sich nach den Untersuchungen aller Autoren hauptsächlich durch Aufschließung der Bakterienleiber gewinnen lassen, hat R. Pfeiffer Endotoxine genannt und sie in Analogie mit den bei Cholera nachgewiesenen Giften gesetzt. Es muß aber hervorgehoben werden, daß R. Pfeiffer den antigenen Charakter dieser Gifte nicht erweisen konnte und sie deshalb als prinzipiell andersartig den bekannten Toxinen gegenübergestellt hat. Es ist ja zweifellos, daß wir, wie ja auch die Untersuchungen von Besredka, Macfadyen und eigene Untersuchungen über Dysenterie-, Cholera-, Meningokokkengifte zeigen, diesen Giften eine Sonderstellung einräumen müssen. Zunächst schon deswegen, weil man in flüssigen Nährböden diese Gifte nicht in der Ausbeute gewinnen kann, wie beispielsweise Diphtherie und Tetanus. Damit ist jedoch noch nicht ausgeschlossen, daß diese Bakterien in vivo in ganz analoger Weise, wie wir es bei den Diphtheriebacillen und anderen Bakterien annehmen, Gifte sezernieren. Gerade die Untersuchungen von Lange und Bail (l. c.) sowie Versuche von Kraus und Russ bei Vibrionen sprechen in diesem Sinne.

Die Frage, ob die Bakteriengifte durch Sekretion entstehen oder im Sinne R. Pfeiffers durch die Zerstörung oder Auflösung der Leiber frei werden und so zur Wirksamkeit gelangen, ist gegenüber der Frage, ob wir diese Gifte als Antigene ansprechen können, zunächst wohl von untergeordneter Bedeutung. Dazu kommt noch, daß es überhaupt nicht möglich ist, exakt zu beweisen, ob wir eine Giftsekretion oder ein Freiwerden der Gifte durch Auflösung der Leiber vor uns haben.

Es ist daher begründet, daß das Hauptgewicht aller Untersuchungen, wie sie von Besredka, Macfadyen begonnen und von uns und anderen fortgeführt wurden, auf den Nachweis der antigenen Natur dieser Gifte gerichtet war.

Es gelingt nun auch in der Tat, durch Immunisierung spezifisch neutralisierende Substanzen zu erzeugen, wenn auch bei nochmaliger Hervorhebung der Sonderstellung dieser Gifte ihre spezifischen Antitoxine nicht in derselben Menge produziert werden wie z. B. die der Diphtherie und des Tetanusgiftes.

Bevor wir jedoch auf diese Verhältnisse näher eingehen, wollen wir die Immunisierungsmethoden besprechen.

Mit der üblichen subkutanen Immunisierung gelingt es zwar nach mehrmonatlicher und selbst ein Jahr dauernder Fortsetzung der regelmäßigen Injektionen, Sera zu gewinnen, die eine spezifisch neutralisierende Wirkung auf die Gifte der Typhusbacillen ausüben, sie konnten aber trotz fortdauernder Immunisierung keine weitere Steigerung erfahren. Demgegenüber ist es bemerkenswert, daß Besredka in seinen Arbeiten über Antitoxine Werte verzeichnet, welche die von uns erzielten Werte um ein vielfaches übersteigen. Er berichtet, daß seine Typhussera (Pferd Lange) in Mengen von 0,05 bis 0,1—1,2 die 10- 12- und mehrfache letale Dosis in vitro zu neutralisieren vermögen. Allerdings gewinnt Besredka sein antitoxisches Serum nicht durch subkutane, sondern durch intravenöse Injektion teils lebender, teils abgetöteter Typhusbacillen. Wenn wir auch keine motivierte Erklärung für diese Sachlage beizubringen vermögen, so möchten wir doch anführen, daß der Art der Immunisierung eine wichtige Rolle für die Antikörperbildung eingeräumt werden muß. So fand Pfeiffer bei Cholera die Antikörperbildung nach subkutaner Vorbehandlung geringer als nach intravenöser. Nach Tallquist gibt eine intravenöse Injektion mit Vibriolysin einen besseren Antitoxinwert als bei subkutaner Injektion. In anderen Fällen allerdings bringt die subkutane Einverleibung der Gifte (z. B. Diphtherie, Botulismus) höhere Antitoxinwerte als die intravenöse (Dziergowsky, Madsen, Forssman).

Die befriedigenden Ergebnisse mit den Typhus-, Cholera-, Pest-, Dysenteriegiften, wofür die Arbeiten von Besredka ausschlaggebend waren, könnten daher in der Art der Einverleibung begründet sein. In diesem Sinne sei noch auf die Arbeit von Aronson, Kraus und Doerr hingewiesen.

Um zu besseren antitoxischen Seris zu gelangen, haben wir daher zunächst versucht, die mit Typhusgift längere Zeit subkutan vorbehandelten Tiere intravenös weiter zu immunisieren. Wir benutzten 2 Ziegen, die seit Juli 1906 bis Januar 1908, also  $1\frac{1}{2}$  Jahr hindurch subkutan regelmäßig teils mit Bouillonkulturfiltraten, teils Agarextrakten vorbehandelt worden waren. Am 24. Januar 1908 (15 Tage nach der letzten Injektion) wurden ihnen 10 ccm Typhusextrakt (10-fach tödliche Dosis für 1000 g Kaninchen) intravenös einverleibt. Beide Ziegen, von denen die eine 30 kg, die andere 40 kg wog, gingen nach 5 resp. 12 Stunden unter den Erscheinungen stärkster Dyspnoë zugrunde. Wir glaubten zuerst diesen unliebsamen Verlust aus der uns bereits bekannten hohen Empfindlichkeit der Ziegen gegenüber dem Typhusgift erklären zu können, auch erinnerte diese Erscheinung an die bereits von v. Behring, später Pfeiffer beschriebene paradoxe Reaktion bei Immunisieren. Wie aber weitere Versuche lehrten, mußten wir bereits damals zu einer anderen Auffassung gelangen. Wir konnten nämlich alsbald konstatieren, daß Tiere, die mit ganz geringen Mengen von Typhus bzw. Paratyphusgiften intravenös vorbehandelt wurden und am Leben bleiben, bei der dritten oder wiederholten intravenösen Injektion der gleichen oder höchsten doppelten Giftmenge in Intervallen von 8—14 Tagen sofort nach der Injektion schwerste Vergiftungserscheinungen darboten. Sie stürzten zusammen, kollabierten und lagen kürzere oder längere Zeit mit schwerer Dyspnoë komatös da. Einzelne erholten sich von diesen Shock langsam im Laufe von Tagen, während welcher Zeit sie matt dalagen und nur wenig fraßen, andere gingen im Verlauf von 8—10 Stunden zugrunde. Tabelle VIII gibt Beispiele von Ziegen, welche wir auf diese Weise verloren haben.

Tabelle VIII.

## Erster Versuch.

Bock 24 bekommt:

1.	II.	1908	0,5	Typhusagarextrakt	intrav.	
13.	II.	"	0,5	"	"	
22.	II.	"	1,0	"	"	} Sofort nach der Infektion fällt das Tier um, wird schwer dyspnoisch, liegt eine Zeitlang komatös und erholt sich nach ca. 30 Stunden
7.	III.	"	2,0	"	"	
18.	III.	"	4,0	"	"	
26.	III.	"	4,0	"	"	
						† nach 10 Stunden

## Zweiter Versuch.

Ziege 16 bekommt:

22.	II.	1908	0,4	Enteritidis Gärtner-Agarextr.	intrav.	
30.	II.	"	1,0	"	"	"
7.	III.	"	2,0	"	"	"
18.	III.	"	3,0	"	"	"
26.	III.	"	3,0	"	"	"

Sofort nach der Injektion  
dieselben Erscheinungen wie  
Bock 24  
† nach 10 Stunden

## Dritter Versuch.

Ziege 44 wird vom 16. IV. bis 3. VIII. subkutan mit Giften des Paratyphus vorbehandelt; bekommt:

13.	II.	1908	0,2	Enteritidis Gärtner	intrav.	
22.	II.	"	1,0	"	"	"
30.	II.	"	1,0	"	"	"
7.	III.	"	3,0	"	"	"
18.	III.	"	5,0	"	"	"
26.	III.	"	5,0	"	"	"

Sofort nach der Injektion die-  
selben Erscheinungen wie Ziege  
16 und Bock 24  
† nach 10 Stunden

Wir glauben aus den nach wiederholter Giftinjektion bei Ziegen so charakteristisch auftretenden sofortigen Krankheitserscheinungen, daß wir es hier mit anaphylaktischen Erscheinungen zu tun haben. Besonders die unmittelbar nach der Injektion auftretenden heftigen Krankheitserscheinungen, die wir bei gesunden Tieren nach intravenöser Erstinjektion dieses Giftes niemals beobachten konnten, auch wenn die Tiere infolge der Injektion zugrunde gingen, erinnern lebhaft an den Symptomenkomplex der Anaphylaxie. Mit der Annahme der Anaphylaxie würde sich auch die paradoxe Tatsache der Ueberempfindlichkeit bei bereits immunisierten Tieren, die, wie wir nachweisen konnten, bereits Antitoxin in ihrer Blutbahn hatten, viel natürlicher erklären, als durch die Annahme, daß gewisse Zellelemente plötzlich giftempfindlicher und avider als das zirkulierende Antitoxin geworden seien.

Einen direkten Beweis für die Auffassung, daß dieses bei mit Typhusbacillen vorbehandelten Ziegen beobachtete Krankheitsbild als Anaphylaxie anzusehen sei, haben Experimente ergeben, welche Kraus und Doerr durchgeführt haben. Sie konnten zeigen, daß subkutan mit geringen Mengen von Typhus-, Cholera-, Dysenteriebacillen vorbehandelte Meer-schweinchen 20 Tage und später nach intravenöser Injektion bestimmter Mengen homologer Bakterienextrakte sofort nach der Injektion typische Erscheinungen der Anaphylaxie darboten. Auch unsere intravenösen Immunisierungsversuche an

kleinen Tieren (Meerschweinchen, Kaninchen) scheiterten infolge des Todes der Versuchstiere an den Erscheinungen der Anaphylaxie. Die von R. Pfeiffer für seine Endotoxintheorie herangezogene Tatsache, wonach mit Typhus und Cholera immunisierte Meerschweinchen und Ziegen auf eine neuerliche Injektion von Bakterienkulturen zugrunde gingen, erscheint uns im Sinne der Anaphylaxie erklärlich. Auch bei Pferden beobachtet man, wie Chantemesse und Besredka zuerst vermerkten, bei der intravenösen Immunisierung starke Reaktionen, so daß die Immunisierung äußerst vorsichtig gehandhabt und nur sehr langsam zu steigenden Dosen übergegangen werden muß. Nach dieser Methode haben wir nun Pferde, da wir bei Ziegen durchwegs Mißerfolge zu verzeichnen hatten, zu immunisieren versucht. Wie die Erfahrungen lehren, kann man durch große Vorsicht in der Dosierung die Klippe der Anaphylaxie umgehen und zu einem antitoxischen Serum gelangen <sup>1)</sup>).

Die Bedenken, die infolge der stürmischen unliebsamen Erscheinungen bei der Immunisierung, namentlich mit vollwertigen Giften sich aufdrängen, haben verschiedene Autoren veranlaßt, Präparate aus Typhuskulturen darzustellen und zur Immunisierung zu verwenden, welchen eine geringe oder gar keine Giftwirkung auf das Tier innewohnte. So verwendete Chantemesse zur Immunisierung 7-tägige Milzbouillonkulturen, welche durch Erhitzen auf 55° mitigiert waren. Besredka verwendet im Anfang der Immunisierung bei 60° abgetötete Typhusagarkulturen, um nach einiger Zeit der Vorbehandlung zu lebenden Agarkulturen überzugehen.

Zu Immunisierungszwecken geeignete Präparate wurden von Hahn, Levy-Blumenthal, Bassenge und M. Mayer, Bassenge angegeben, doch betreffen die damit angestellten Versuche nur kleine Tiere.

Für die Immunisierung von Pferden verwendeten P. Bergell und F. Meyer in ein folgender Weise gewonnenes ungiftiges Präparat mit Erfolg.

Zweitägige Agarkulturen (Ascitesagar) wurden mit Kochsalz aufgeschwemmt und in hohen Standgefäßen sedimentieren gelassen, dann längere Zeit zentrifugiert, das Sediment gut

1) Besredka, Bullet. de l'Inst. Pasteur, 1909, No. 17.

gewaschen und im Vakuum bei 40° scharf getrocknet. Diese Masse behandelten sie mit gut getrockneter, wasserfreier, durch flüssige Luft kondensierter Salzsäure. Das flüssige Gas wurde unter Vermeidung von Wasserzutritt verdampft, der Rückstand mit physiol. NaCl mittels Schüttelmaschine gut extrahiert und durch Berkefeld filtriert.

Aronson empfiehlt zur intravenösen Vorbehandlung bei Pferden Filtrate, welche mit Jodtrichlorid versetzt wurden.

### III. Ueber giftneutralisierende Wirkung des Typhus-immunserums.

Um den Nachweis der giftneutralisierenden Eigenschaften der mit Typhusgiften vorbehandelten Tiere zu erbringen, haben wir das Serum dieser Tiere, nachdem sie längere Zeit in Vorbehandlung gestanden sind, mit dem Gift in vitro gemischt und intravenös Kaninchen im Gewicht von 800—1000 g injiziert. Die verwendete Giftdosis entsprach gewöhnlich der 2-fach letalen Dosis für Kaninchen. Aus den Versuchen, wie die folgenden Tabellen IX, X, XI, XII, XIII, XIV lehren, ergibt sich, daß dem Serum der vorbehandelten

Tabelle IX.

Serum	Serum-menge	Gift	Tier	Injektion	Resultat
Pferdeserum „Karl“	1,0 ccm	3,0 ccm	Kan.	intraven.	†
Vor der Immunisierung	0,5 „	3,0 „	„	„	†
I. Aderlaß	1,0 „	3,0 „	„	„	⊕
	0,5 „	3,0 „	„	„	†
II. Aderlaß	1,0 „	3,0 „	„	„	⊕
	0,5 „	3,0 „	„	„	⊕
	0,1 „	3,0 „	„	„	⊕
Kontrollen {	„Gigant“ (Typhus)	0,5 „	2,0 „	„	†
	„Edgar“ (Typhus)	0,5 „	2,0 „	„	†
	„Jobst“ (Dysenterie)	0,5 „	2,0 „	„	†
	„Infant“ (Dysenterie)	0,5 „	2,0 „	„	†
	„Klipp“ (Dysenterie)	0,5 „	2,0 „	„	†
	„Comtesse“ (Dysenterie)	1,0 „	3,0 „	„	†
	„Ramè“ (Cholera)	1,0 „	3,0 „	„	†
	—	3,0 „	„	„	†
	—	1,0 „	„	„	†
Besredka	0,01 g	2 „	„	„	†
Trockenserum	0,02 „	2 „	„	„	⊕
(Lösung in phys. Kochsalz-	0,1 „	4 „	„	„	⊕
lösung)	0,3 „	6 „	„	„	⊕
	—	2 „	„	„	†

Tabelle X.

Serum	Serum- menge	Gift	Tier	Injektion	Resultat
Ziegenserum 36 (Agarkultur)	0,5 ccm	3,0 ccm	Kan.	intraven.	+
I. Aderlaß	0,1 "	3,0 "	"	"	+
III. Aderlaß	0,5 "	3,0 "	"	"	+
	0,1 "	3,0 "	"	"	+
Ziegenserum 25 (Toxin)	0,1 "	3,0 "	"	"	+
	0,5 "	3,0 "	"	"	+
I. Aderlaß	0,1 "	3,0 "	"	"	+
	0,05 "	3,0 "	"	"	+
II. Aderlaß	0,5 "	4,0 "	"	"	+
	0,1 "	4,0 "	"	"	+
IV. Aderlaß	0,5 "	3,0 "	"	"	+
	0,1 "	3,0 "	"	"	+
Kontr. } Norm. Ziegenserum	1,0	3,0	"	"	+
	—	2,0	"	"	+

Tabelle XI.

Datum	Toxin	Menge ccm	Serum	Menge ccm	Tier- art	Art der Einver- leibung	Resultat
19. X. 08	Typhus XIII	1,5	Laura (Pferd)	1,0	Kan.	intrav.	lebt
	Agarextrakt (Kochsalz)		Aderlaß 11. VIII. 08				
19. X. 08	dgl.	1,5	dgl.	0,5	"	"	+ 1 Tag
19. X. 08	dgl.	1,5	N.Pf.Ser. I	1,0	"	"	+ 6 Std.
19. X. 08	dgl.	1,5	N.Pf.Ser. II	1,0	"	"	+ 6 "
19. X. 08	dgl.	1,5	N.Pf.Ser. III	1,0	"	"	+ 6 "
19. X. 08	Typhus XIII	1,5	—	—	"	"	+ 6 "
29. X. 08	Konradi 8 Agar- extrakt (Koch- salz)	1,5	Laura (Pferd)	1,0	"	"	lebt
29. X. 08	dgl.	1,5	dgl.	0,5	"	"	+ 2 Tag.
29. X. 08	dgl.	1,5	N.Pf.Ser. I	1,0	"	"	+
29. X. 08	dgl.	1,5	N.Pf.Ser. II	1,0	"	"	+
29. X. 08	Konradi 8	0,5	—	—	"	"	+
29. X. 08	Konradi 8 Agar- extrakt (Natronlauge)	1,0	Laura (Pferd)	1,5	"	"	+ n. 8 Tg.
29. X. 08	dgl.	1,0	dgl.	0,5	"	"	lebt
29. X. 08	dgl.	1,0	dgl.	0,2	"	"	lebt
29. X. 08	dgl.	1,0	—	—	"	"	+ 5 Std.



Tabelle XII.

Datum	Toxin	Menge ccm	Serum	Menge ccm	Tier- art	Art der Einver- leibung	Resultat
30. X. 08	Konradi 8 Agarextr. (Natron- lauge)	0,2	Laura (Pferd) Aderlaß 11. VIII. 08	1,0	Maus	intraperit.	lebt
30. X. 08	dgl.	0,2	dgl.	0,5	"	"	lebt
30. X. 08	dgl.	0,2	dgl.	0,1	"	"	† n. 4 Tag.
30. X. 08	dgl.	0,2	N.-Pferdeser.	1,0	"	"	†
30. X. 08	dgl.	0,2	"	0,5	"	"	†
30. X. 08	dgl.	0,2	"	0,1	"	"	†
30. X. 08	dgl.	0,2	—	—	"	"	†

Tabelle XIII.

Datum	Serum	Menge ccm	Toxin	Menge ccm	Tier- art	Art der Einver- leibung	Resultat
8. VII. 09	Napoleon	2,0	24 <sup>h</sup> nach- her Straß- burg (Agar- extrakt)	1,0	Kanin.	intrav.	† n. 2 Tag.
8. VII. 09	"	5,0	dgl.	1,0	"	"	lebt
8. VII. 09	N.-Pferdeser.	2,0	dgl.	1,0	"	"	†
8. VII. 09	"	5,0	dgl.	1,0	"	"	†
8. VII. 09	—	—	dgl.	1,0	"	"	†
8. VII. 09	—	—	dgl.	0,5	"	"	†

Tabelle XIV.

Datum	Toxin	Menge ccm	Serum	Menge ccm	Tier- art	Art der Einver- leibung	Resultat
9. VII. 09	Konradi 8 (Agarextrakt, Natronlauge)	1,0	Günter	0,5	Kanin.	intraven.	lebt
9. VII. 09	dgl.	1,0	"	0,3	"	"	† n. 1 Tag
9. VII. 09	dgl.	1,0	Napoleon	0,5	"	"	lebt
9. VII. 09	dgl.	1,0	"	0,3	"	"	† n. 5 Tag.
9. VII. 09	Straßburg Agarextrakt (Natronlauge)	1,0	Günter	0,5	"	"	lebt
9. VII. 09	dgl.	1,0	"	0,3	"	"	lebt
9. VII. 09	dgl.	1,0	Napoleon	0,5	"	"	† n. 5 Tag.
9. VII. 09	dgl.	1,0	"	0,3	"	"	† n. 5 Tag.
9. VII. 09	Konradi	1,0	N.-Pferdeser.	0,5	"	"	† n. 12 Std.
9. VII. 09	Straßburg	1,0	"	0,5	"	"	† n. 12 Std.
9. VII. 09	Konradi	1,0	—	—	"	"	† n. 12 Std.
9. VII. 09	Straßburg	1,0	—	—	"	"	† n. 12 Std.

Tiere eine giftneutralisierende Wirkung in Mengen zukommt, in welchen weder das Serum normaler, noch das mit anderen Toxinen (Cholera, Dysenterie) immunisierter Tiere sich wirksam erwies. Allerdings sind die Werte der Immunsera nur gering und verhalten sich in dieser Beziehung ähnlich wie Dysenterie- und Meningokokkenserum. Im Prinzip aber sind die Sera spezifisch neutralisierend, was aus den Protokollen zur Genüge hervorgeht.

Wir befinden uns hiermit in Uebereinstimmung mit den früheren Arbeiten von Chantemesse, Besredka, Macfadyen usw. Chantemesse erzielte durch eine 2 Jahre fortgesetzte Immunisierung mit Typhusfiltraten beim Pferd ein Serum mit folgendem Titer:  $\frac{1}{50}$  ccm Serum schützte Meerschweinchen gegen die letale Dosis,  $\frac{1}{20}$ — $\frac{1}{30}$  ccm schützte präventiv Kaninchen von 1000—1200 g,  $\frac{1}{4}$ —4 ccm schützten kurativ Meerschweinchen gegen die letale Dosis.

Während Chantemesse nur die einfach tödliche Dosis mit seinem Serum neutralisierte, gewann Besredka ein antitoxisches Pferdeserum, welches in Mengen von 0,05 bis 1,0 bis 2,0 ccm gegen die 5—10—12-fach tödliche Dosis seines Endotoxins für Meerschweinchen schützte. 0,2 g Trockenserum war sogar imstande, 32 tödliche Dosen (Meerschweinchen von 300 g) Endotoxin zu neutralisieren. Auch präventive und kurative Werte konnte er verzeichnen. Daß Besredkas Serum mit unserem identisch sein dürfte, beweisen die mit diesem Serum und unserem Gifte angestellten Versuche. Es gelang, wie in Tabelle IX angeführt ist, mit dem uns von Besredka freundlich überlassenen Trockenserum unser Toxin, gewonnen mit Bouillonkulturen, zu neutralisieren.

Auch Macfadyen verzeichnet hohe Werte seines Ziegenimmunserums.  $\frac{1}{50}$  ccm Ziegenserum schützte gegen 30-fache letale Endotoxindosis (Kaninchen); bei getrennter Einverleibung (Endotoxin in die eine und Serum in die andere Ohrvene beim Kaninchen) neutralisierte 1 ccm Serum die 5-fach letale Endotoxindosis; mit 2 ccm seines Serums konnte er nach  $\frac{3}{4}$  Stunde Tiere, die mit der 5-fach tödlichen Dosis Endotoxin vergiftet waren, heilen, woraus ein hoher kurativer Wert seines Serums hervorgeht.

Auch Meyer und Bergell zeigten, daß ihre Immunsera (gewonnen bei Pferd und Schaf) Kaninchen gegen letale Vergiftung mit Typhusgift schützten. Aronsons Typhusserum entfaltete deutliche Schutzwirkung gegen Typhusgift, besonders wenn es mehrere Stunden in vitro vor der Injektion gemischt wurde oder wenn er das Serum 24 Stunden vor dem Toxin injizierte. Diese präventive Schutzwirkung haben wir ebenfalls bei wiederholten Versuchen konstatieren können, und scheint uns, daß der präventive und Gemischwert nicht immer parallel zu gehen scheinen. Nach den Mitteilungen von Gottstein und Matthes schützte das Serum einer mit Fermotoxin immunisierten Ziege, wenn das Immunserum 6 Stunden vor der Vergiftung mit Fermotoxin injiziert wurde. (0,1 ccm Ziegenserum, 6 Stunden darauf 0,5 Fermotoxin, Meerschweinchen (230) bleibt am Leben; 0,5 Fermotoxin + 0,1 Immunziegenserum simultan, Meerschweinchen (230) geht rapid zugrunde.) Sie konnten so ein Serum (Ziege) gewinnen, welches auch antitoxische Eigenschaften aufwies, indem es gegen die doppelte Dosis Fermotoxin in einer Dosis von 0,1 ccm zu schützen imstande war.

Jedenfalls geht aus allen vorliegenden Arbeiten hervor, daß ein mit Typhusgiften vorbehandeltes Tier imstande ist, spezifische Gift neutralisierende Substanzen zu produzieren, und daß man daher diesen Giften eine antigene Eigenschaft zusprechen muß.

Allerdings sehen wir aus einer Reihe von Arbeiten (Meyer und Bergell, Aronson, Lagriffoul, Gottstein und Matthes, Chantemesse), daß derartige Sera neben ihrer antitoxischen Komponente noch in anderer Hinsicht spezifische Wirksamkeit entfalten (wie antiinfektiöse, antiaggressive, bakteriotrope). Es drängt sich daher die Frage auf, welche Bedeutung diesen anderen Immunkörpern zugesprochen werden muß, namentlich dann, wenn wir zur eigentlichen Nutzanwendung dieser Sera bei der Bekämpfung der natürlichen Infektion beim Menschen schreiten. Vorderhand sind uns in dieser Richtung nur die Mitteilungen von Chantemesse bekannt, der auf Grund seiner Versuche an Kaninchen annimmt, daß das Serum den Körperzellen sicher und energisch hilft die Typhusbacillen zu destruieren. Bei mit Immunserum injizierten

Kaninchen bemerkte er, daß in die Haut der Ohren injizierte Bacillen rasch der Phagocytose unterliegen, während sich bei den Testtieren die Bacillen vermehren, wie in der Kultur. Dasselbe Typhusserum konnte auch gegen Toxin schützen. Auf der Basis dieser Tierexperimente stellt sich Chantemesse auch die Wirkung seines Serums beim typhusinfizierten Menschen als eine Anregung zur Vermehrung der phagocytären Kraft der weißen Blutkörperchen gegen den Eberth'schen Bacillus vor, also eine Vermehrung der Wright'schen Opsonine. Unverständlich bleibt allerdings, wie einer, gelinde gesagt, homöopathischen Serumdosis (Chantemesse injizierte einige Tropfen subkutan in die Rückseite des Vorderarmes) so eklatante Erfolge, wie sie Chantemesse verzeichnet, zugesprochen werden können.

Es sei noch hervorgehoben, daß auch in unseren Seris sich mühelos Bakterientropine im Sinne Neufeld's nachweisen lassen. So konnte noch deutliche Phagocytose befördernde Wirkung bei den Pferdeimmunseris in einer Verdünnung von 1:3000 bis 1:5000 nachgewiesen werden, während normale Pferdesera oder auch andersartige Immunsere nur in Verdünnungen von 1:50 bis 1:100 sich als wirksam erwiesen. Derzeit soll also die Frage offen gelassen werden, ob die giftneutralisierenden Körper allein bei der Serumtherapie der menschlichen Typhusinfektion oder auch andere Immunkörper, so z. B. die Bakteriotropine (Neufeld), Lysine, besonders berücksichtigt werden müssen.

### Zusammenfassung.

Aus Agar- und Bouillonkulturen des Typhusbacillus lassen sich Gifte gewinnen, welchen antigener Charakter zuzuschreiben ist. Das mit diesen Giften gewonnene Serum neutralisiert spezifisch die Gifte der Typhusbacillen. Den Giften der Typhusbacillen muß so wie denjenigen der Choleravibrionen, Meningokokken eine besondere Stellung eingeräumt werden. Die Versuche, welche in zwei Epidemien mit diesem Serum angestellt wurden, sollten fortgesetzt werden, da bei frühzeitiger Anwendung des Serums der Krankheitsverlauf abgekürzt werden dürfte.

**Literatur.**

- Aronson, H., Berl. klin. Wochenschr., 1907, No. 18.  
 Bassenge, Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 4.  
 — und Mayer, Centralbl. f. Bakt., 1904, No. 3.  
 Bergell und Mayer, Med. Klinik, 1906.  
 Besredka, Ann. de l'Institut. Pasteur, Juillet 1905.  
 — Ann. de l'Institut. Pasteur, Févr. 1906.  
 — Ann. de l'Institut. Pasteur, Avril 1906.  
 Beumer und Peiper, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 2, 1887.  
 — — Zeitschr. f. klin. Medizin, 1895.  
 Bitter, Zeitschr. f. Hygiene, 1892.  
 Brieger, Weitere Beobachtungen über Ptomaine, Berlin 1885.  
 — Untersuchungen über Ptomaine, Berlin 1886.  
 — Deutsche med. Wochenschr., 1902, No. 27.  
 — und Mayer, Deutsche med. Wochenschr., 1903, No. 18.  
 — — Deutsche med. Wochenschr., 1904.  
 — und Wassermann, Charité-Ann., 1892.  
 Chantemesse, Presse médicale, 1902.  
 — Société de Biologie, 1897, p. 96.  
 — IX. Cong. internacional de Hyg. y Demografia, April 1898.  
 — Hygienischer Kongreß Berlin, 1907.  
 Gottstein, E., Deutsches Arch. f. klin. Medizin, Bd. 94, 1908.  
 Hahn, M., Münch. med. Wochenschr., 1897.  
 — Münch. med. Wochenschr., 1906, No. 23.  
 Jamanouchi, Compt. rend. de la Soc. de Biol., 1909.  
 Kraus und v. Stenitzer, Wiener klin. Wochenschr., 1907, No. 12.  
 — — Wiener klin. Wochenschr., 1908, No. 18.  
 Lange, M., Compt. rend. de la Société de Biologie, 1905, 6. Mai.  
 Levy und Blumenthal, Med. Klinik, April 1906.  
 Lüdke, Physik.-med. Gesellschaft zu Würzburg, Sitzung vom 1. Juli 1909.  
 Macfadyen, Allan, and Sydney, Rowland, Centralbl. f. Bakt.,  
 Bd. 30, 1901.  
 — Naturforscherversammlung 1903.  
 — Centralbl. f. Bakt., 1906.  
 Matthes, M., Deutsches Archiv f. klin. Medizin, Bd. 95, 1909, Heft 3  
 und 4, II. und III. Mitteilung.  
 Meyer und Bergell, Berliner klin. Wochenschr., 1907, No. 18.  
 Moreschi, Archiv. per le Scienze mediche, Vol. 29, 1905.  
 Neisser und Shiga, Deutsche med. Wochenschr., 1903, No. 4.  
 Pfeiffer, R., Deutsche med. Wochenschr., 1894, No. 48.  
 — und Kolle, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 21, 1896.  
 — und Friedberger, Centralbl. f. Bakt., 1908.  
 Rodet und Lagriffoul, Centralbl. f. Bakt., 1906, Heft 4.  
 Sirotinin, Zeitschr. f. Hygiene, 1886.  
 v. Stenitzer, Handbuch der Technik und Methodik der Immunitäts  
 forschung, Bd. 1, p. 193; Bd. 2, p. 217.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der k. k. Pädiatrischen Klinik (Vorstand: Hofrat Prof. Escherich) und dem k. k. Serotherapeutischen Institut (Vorstand: Hofrat Prof. Paltauf).]

### **Versuche über homologe und heterologe passive Anaphylaxie.**

Von Dr. J. Novotný und Dr. B. Schick.

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. September 1909.)

Wir wissen, daß durch Vorbehandlung des Menschen oder eines Tieres mit artfremdem Serum eine Ueberempfindlichkeit gegenüber neuerlich eingebrachtem artfremden Serum derselben Species ausgelöst wird. Diese Ueberempfindlichkeit äußert sich bei Mensch und Tier nicht vollkommen gleich. Schon bei der ersten Injektion von artfremdem Serum verhalten sich Mensch und Tier nicht identisch. Während wir beim Menschen nach einer Inkubationszeit von 8—12 Tagen eine Reihe von klinischen Symptomen (Fieber, Exantheme, Drüenschwellung, Oedeme etc.) ablaufen sehen, fehlt beim Tiere die klinisch nachweisbare Erkrankung nach der ersten Injektion.

Bei Wiedereinführung des artfremden Serums derselben Species ca. 12 Tage bis einige Monate nach der ersten Injektion ist die Reaktionsfähigkeit des Organismus gegen das artfremde Serum verändert. Im Gegensatze zur ersten Injektion treten bei Mensch und Tier die Krankheitssymptome sofort, beziehungsweise innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Reinjektion ein. Diese Symptome sind entweder auf die Gegend der Injektionsstelle beschränkt (spezifisches lokales Oedem), oder es entwickeln sich Allgemeinsymptome, die beim Menschen durch Ausbruch allgemeiner Urticaria, Fiebersteigerung, Oedembildung im Gesicht gekennzeichnet sind und in manchen Fällen von schweren Kollapszuständen (Cyanose, Dyspnoë, elender Puls) begleitet werden. Diese schweren Kollapssymptome sind bei Tieren (bei intravenöser oder intracerebraler Wiedereinführung des artfremden Serums) die Regel und führen meist zum Tode des Tieres. (Anaphylaxie.)

Bezüglich der sofortigen Lokal- und Allgemeinreaktion besteht zwischen Mensch und Tier ein wesentlicher Unter-

schied in zeitlicher Beziehung. Während nämlich die sofortige Reaktion beim Menschen selten später als 4 Monate nach der ersten Injektion von artfremdem Serum beobachtet wird, sehen wir beim Tiere eine sozusagen unbegrenzte Dauer der sofortigen Reaktionsfähigkeit. Rosenau und Anderson konnten diese beim Meerschweinchen noch am 732. Tage nach der ersten Injektion nachweisen.

Beim Menschen sind überdies mit der sofortigen Reaktion nicht alle Erscheinungen nach Reinjektion artfremden Serums erschöpft. 4—6 Tage nach der zweiten oder wiederholten Seruminjektion tritt unter Fieber allgemeine Urticaria auf. Ist seit der Erstinjektion mehr Zeit als 4 Monate verstrichen, so fällt gewöhnlich die sofortige Reaktion weg und es verbleibt nur der zweite Teil der Erscheinungen. Da gegenüber der Erstinjektion mit einer Inkubationszeit von 8—12 Tagen hier das Inkubationsstadium auf die Hälfte verkürzt erscheint, haben v. Pirquet und Schick diese Form der Serumkrankheit die beschleunigte Reaktion genannt. Die Fähigkeit zur beschleunigten Reaktion scheint viele Jahre hindurch vorhanden zu sein. Beim Tier fehlt dieser beim Menschen so scharf ausgeprägte Symptomenkomplex.

Ohne auf weitere theoretische Details einzugehen, wollen wir hervorheben, daß angenommen wird, es bilden sich durch Vorbehandlung von Mensch und Tier mit artfremdem Serum „Reaktionskörper“, die bei Reinjektion des artfremden Serum derselben Species sofort in Aktion treten können. Das Vorhandensein dieses anaphylaktischen Reaktionskörpers suchte man dadurch nachzuweisen, daß man das Serum vorbehandelter Tiere auf gesunde unvorbehandelte Tiere übertrug und diese auf ihr Verhalten gegen das entsprechende Serum prüfte. (Passive Anaphylaxie.)

Von allen Autoren, die sich mit der passiven Uebertragbarkeit der Anaphylaxie beschäftigten, haben nur Rosenau und Anderson versucht, die beim Menschen nach Injektion von Pferdeserum auftretenden Reaktionskörper auf Meerschweinchen zu übertragen. Sie untersuchten meist in beträchtlichen Intervallen von der ersten Seruminjektion und erhielten negative Resultate.

Der Versuch dieser Autoren, die Anaphylaxie von Affen auf die übrigen Versuchstiere — Meerschweinchen — zu über-

tragen, schlugen fehl. Alle übrigen Autoren, von Arthus, v. Pirquet und Schick bis Besredka, Kraus und Doerr, Kraus und Biedl arbeiteten nur mit Tieren (Meerschweinchen, Kaninchen, Hund). Diese Versuche ergaben, daß das Serum vorbehandelter (überempfindlicher) Tiere, in entsprechenden Abständen von der Vorbehandlung mit artfremden Serum geprüft, jene Stoffe enthält, welche, auf ein normales Tier derselben Species übertragen, anaphylaktische Erscheinungen dann auslösen, wenn 24—48 Stunden nach der intraperitonealen oder intravenösen Injektion dieses Serums, das zur Vorbehandlung des anaphylaktischen Tieres verwendete Serum intraperitoneal, intracerebral oder intravenös eingeführt wird. Als sicherste Methode erwies sich hierbei die intraperitoneale Injektion des normalen Tieres mit dem Serum des anaphylaktischen Tieres und die 24—48 Stunden darnach erfolgende intravenöse Injektion des zur Vorbehandlung des anaphylaktischen Tieres verwendeten Serums. (Homologe passive Anaphylaxie).

Bei diesen Versuchen wurde von Otto, Rosenau und Anderson, Besredka und Steinhart noch aufgedeckt, daß diejenigen Tiere, welche die anaphylaktischen Erscheinungen überlebten, durch längere Zeit gegen eine neuerliche Injektion des artfremden Serums unempfindlich — antianaphylaktisch waren. Diese Antianaphylaxie ist gleichzeitig ein neuerliches Kriterium für die Spezifität der vorausgegangenen anaphylaktischen Symptome.

Auch die heterologe Uebertragbarkeit anaphylaktischer Reaktionskörper von Kaninchen auf Meerschweinchen ist durch Otto und andere nachgewiesen worden. Will man zu analogen Versuchen beim Menschen übergehen, so müssen die eingangs erwähnten Unterschiede zwischen Reaktion des Menschen und der Versuchstiere berücksichtigt werden. Da man beim Tier nur die sofortige Reaktion beurteilen kann, so muß die Untersuchung des menschlichen Serums auf Vorhandensein anaphylaktischer Reaktionskörper innerhalb derjenigen Zeit erfolgen, in welcher beim Menschen die sofortige Reaktionsfähigkeit besteht. Wir haben erwähnt, daß diese Zeit zwischen 10—12 Tagen bis 4 Monate nach der ersten Injektion des artfremden Serums liegt. Die stärksten Erscheinungen findet



man bei Reinjektion des Menschen 3—4 Wochen nach der ersten Injektion.

Wir wählten zu unseren Versuchen Kinder der Scharlachabteilung, die wegen schwerer Scharlacherkrankung mit 200—400 ccm Scharlachserum Moser (Pferdeserum) subkutan injiziert wurden. Außerdem wurde auch das Serum zweier mit Diphtherieserum behandelter Kinder untersucht; denn falls die Uebertragbarkeit der Anaphylaxie bei den mit großen Serumdosen vorbehandelten Scharlachkindern mißlang, mußte man dem Einwande begegnen, daß eben nur Vorbehandlung mit kleinen Serumdosen zum Auftreten übertragbarer anaphylaktischer Reaktionskörper führe. Dieser Einwand war mit Rücksicht auf die größere Empfindlichkeit der Tiere bei Vorbehandlung mit kleinen Serumdosen nicht von der Hand zu weisen. Zur Kontrolle prüften wir das Serum nicht injizierter gesunder Kinder und das Serum der injizierten Kinder vor der Injektion. Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen im Durchschnittsgewichte von 300 g gewählt. Die Vorbehandlung erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 1,9—5 ccm des zu prüfenden Menschenserums, welches unmittelbar vorher durch Aderlaß gewonnen wurde. 4 Stunden nachher erfolgte intravenöse Injektion von 1—2 ccm Normalpferdeserum.

Bei den ersten zwei Kindern Otto H. und Emanuel K. nahmen wir zur Vorbehandlung der Tiere 4 $\frac{1}{2}$  resp. 5 ccm Serum. Beide Meerschweinchen gingen wenige Stunden danach ein und zeigten bei der Obduktion peritoneales hämorrhagisches Exsudat. Es ist möglich, daß das Serum dieser Patienten in dieser großen Dosis schon an sich oder infolge der besonders schweren Erkrankung toxisch wirkte.

Wir lassen nun die Versuchsprotokolle folgen.

Tabelle I.

Normales Menschenserum, injiziert Meerschweinchen, nachinjiziert normales Pferdeserum.

Zahl	Datum	Name	Alter	Meerschw.		Menge Menschenser. inj. intraperit. ccm	Normalpferdeser. nach 24 <sup>h</sup> injiziert intraven. ccm	Anmerkung
				No.	Gewicht g			
1	11. V.	Franz Tom.	10	171	280	2	2	keine Erscheinungen
2	15. V.	Eduard R.	6	27	270	2	2	dgl.
3	8. V.	Therese M.	5	224	290	1,5	2	dgl.
4	6. V.	Anna C.	7	830	300	2	1	dgl.
5	6. V.	Anna C.	7	258	300	1,9	2	dgl.
6	6. V.	Gustav H.		941	300	2	1	dgl.
7	6. V.	Gustav H.		129	300	2	2	dgl.

Tabelle II.  
Menschenserum (Vorbehandlung mit Pferdeserum).

Zahl	Datum	Name	Alter, Jahre	Vorbehandelt		Meerschweinschen				Anmerkung
				vor ? Tagen	mit ? ccm Pferdeser.	No.	Ge- wicht g	Menge Menschenser. intrapert. ccm	N.-Pf.-S. reinjiziert n. 24 <sup>h</sup> intraven. ccm	
1	28. V.	Josef T.	4	2	200	199	290	2	2	
2	14. VI.	Karl Z.	10	5	200	215	300	2	2	
3	14. VI.	Karl Z.		5	200	393	300	3	2	
4	21. VI.	Hans S.	7	3	200	434	280	3	2	
5	21. VI.	Hans S.		3	200	444	290	2,5	2	
6	8. V.	Maria B.	7	7	5 ccm	228	300	2	1	
7	8. V.	Maria B.		7	Diphth.-	299	280	2	1	
8	10. V.	Maria B.		7	Serum	112	280	4	2	
9	21. V.	Franz T. s. No. 1		12	200 Pf.-Ser.	206	320	2	2	
10	7. VI.	Josef T.	4	12	200	282	300	2	2	
11	7. VI.	Josef T.		12		827	300	3	2	
12	8. V.	Emilie K.	8	16	10 ccm	160	320	2	2	
13	8. V.	Emilie K.		16	Diphth.-	219	250	2	1	
14	10. V.	Emilie K.		16	Serum	282	280	3,5	2	
15	3. V.	Otto H.	7	17	400 Pf.-Ser.	97	270	4,5		Nach 4 <sup>h</sup> †, Sekt.-Bef. ergibt häm. Exsudat
16	4. V.	Otto H.		17		weiß	600	1,8	1	Nach 1' Erstick.-Anf. nach weiteren 3' †
17	1. VI.	Eduard R.	6	18	200	361	290	2	2	
18	1. VI.	Eduard R.		18	Pf.-Ser.	370	300	2	2	
19	2. VI.	Eduard R.		18		20	300	3,5	2	
20	30. VI.	Karl Z.	10	21	200	462	300	3	2	
21	30. VI.	Karl Z.		21	Pf.-Ser.	533	290	2	2	
						912	260	5		
22	3. V.	Emanuel K.	8	23	200	schwarz weiß	600	2	0,5 1,0	Nach 18 <sup>h</sup> †, Sekt.-Bef. = seröses Exsudat
23	4. V.	Emanuel K.		23	Pf.-Ser.					Keine Sympt., nach 5' nachinj., zeigt schw. Dyspn., nachh. Lähm. der hint. Extr. n. an- dauernd schw. Sympt. in 21' †.
24	1. VI.	Franz T.	10	23	200	155	320	2	2	
25	1. VI.	Franz T.		23	Pf.-Ser.	330	300	2	2	
26	2. VI.	Franz T.		23		321	300	3,5	2	
27	7. VI.	Eduard R.	6	23	200	305	320	2	2	
28	7. VI.	Eduard R.		23		345	300	3	2	
29	7. VI.	Josef T.	4	26	200	431	300	2	2	
30	12. VII.	H. Schw.	7	26	200	507	290	2	2	
31	12. VII.	H. Schw.		26	200	505	300	3	2	

n. 48<sup>h</sup>

Nur die mit Serum No. 16 und 23 vorbehandelten Meerschweinchen zeigten bei der 24 Stunden darnach erfolgenden intravenösen Reinjektion Erscheinungen, die als Anaphylaxie gedeutet werden könnten. Das erste Tier ging nach 3 Minuten unter Erstickungserscheinungen ein, das zweite nach 21 Minuten unter Dyspnoë und Lähmung der hinteren Extremitäten. Alle übrigen Versuchstiere blieben ohne Erscheinungen, obwohl Serummenge der Vorbehandlung und Nachbehandlung variiert wurde. Wir können daraus schließen, daß eine gesetzmäßige Uebertragbarkeit anaphylaktischer Reaktionskörper von Mensch auf Tier auch in der Zeit der sofortigen Reaktionsfähigkeit nicht vorhanden ist. Wir tragen sogar Bedenken, die zwei positiven Befunde am 16. und 23. Krankheitstage nach der Injektion im Sinne der Möglichkeit einer solchen Uebertragung zu verwerten, um so mehr, als Kraus nachweisen konnte, daß durch Vorbehandlung von Meerschweinchen mit verschiedenen Substanzen eine nicht spezifische Ueberempfindlichkeit auch für Pferdeserum ausgelöst werden kann. Wir mußten daran denken, daß der negative Ausfall unserer Untersuchungen darin seine Erklärung findet, daß die für den Menschen in Betracht kommenden Reaktionskörper nur für den Menschen und nicht für das Meerschweinchen wirksam sind, d. h. daß die heterologe passive Anaphylaxie, geprüft von Mensch auf Meerschweinchen, undurchführbar ist.

Wir haben zur Vollständigkeit die homologe und heterologe Uebertragbarkeit der Anaphylaxie neuerdings geprüft und konnten die homologe Anaphylaxie analog den Befunden der Autoren bestätigen.

Als Nebebefund können wir erwähnen, daß Meerschweinchen, mit Menschenserum + Pferdeserum vor 51 Tagen vorbehandelt, anaphylaktische Reaktionskörper für Menschenserum enthalten, denn 2 Meerschweinchen, mit 3 ccm dieses Meerschweinchen-serums intraperitoneal vorbehandelt, zeigen bei 24 Stunden darnach erfolgender intravenöser Nachinjektion von 2 ccm Menschenserum typische anaphylaktische Erscheinungen.

Versuche heterologer Uebertragbarkeit der Anaphylaxie von Hund auf Kaninchen und von Meerschweinchen auf Kaninchen schlugen sämtlich fehl.

Wir bringen hier nur die Protokolle der Versuche über heterologe passive Anaphylaxie.

Tabelle III.

Kaninchen. Vorbehandlung mit normalem Hundeserum. Nachinjektion mit Normalpferdeserum.

Datum	Kan. No.	Ge- wicht	Menge Hunde- serum intraperit.	Nachinjektion nach 24 <sup>h</sup> N.Pf.S. intravenös	An- merkung
14. VI.	191	1700	5 ccm	2 ccm	θ
14. VI.	126	1600	3 „	2 „	θ

Kaninchen. Vorbehandlung mit Serum eines gegen Pferdeserum anaphylaktischen Hundes. Nachinjektion mit Normalpferdeserum.

Datum	Kan. No.	Ge- wicht	Menge Hunde- serum intraperit.	Nachinjektion nach 24 <sup>h</sup>	An- merkung
14. VI.	186	1800	5 ccm	2 ccm	θ
14. VI.	327	1600	5 „	2 „	θ

Tabelle IV.

Kaninchen. Vorbehandelt mit Serum von gegen Pferdeserum anaphylaktischen Meerschweinchen. Nachbehandlung nach 24—48 Stunden mit N.Pf.S.

Datum	Kan. No.	Ge- wicht	Vorbehandelt intraperitoneal	N.Pf.Ser. intravenös nach		An- merkung
				24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	
21. VI.	432	—	3 ccm	—	—	
22. VI.	432	—	4 „	—	4 ccm	θ
21. VI.	14	—	3 „	5 ccm	4 ccm	θ
21. VI.	409	—	5 „	2 ccm	—	θ
21. VI.	348	—	5 „	4 „	—	θ
21. VI.	348	—	—	—	2 ccm	θ

Kaninchen. Vorbehandelt mit Meerschweinchenserum (enthaltend anaphylaktische Reaktionskörper gegen Pferdeserum), Nachinjektion mit Normalpferdeserum.

Datum	Kan. No.	Ge- wicht	Vorbehandelt intraperitoneal	Nachinjektion N.Pf.S. nach 24 <sup>h</sup>	An- merkung
24. VI.	362	1600	10 ccm	intravenös 4 ccm	θ
24. VI.	87	1600	6 ccm	4 ccm	θ

Ebenfalls negativ fiel der Versuch aus, mit dem Serum von Meerschweinchen, die für Menschenserum anaphylaktisch waren, bei Kaninchen Anaphylaxie für Menschenserum auszulösen.

Tabelle V.

Kaninchen. Vorbehandlung mit Serum von gegen Menschenserum anaphylaktischen Meerschweinchen. Nachinjiziert Menschenserum nach 48<sup>b</sup> intravenös.

Datum	Kan. No.	Gewicht	Anaphyl. Meerschweinchenser. intraperitoneal	Nachinjiziert mit Menschenserum nach 48 <sup>b</sup> intravenös	
24. VI.	165	1900	10 ccm	5 ccm	} keine Erscheinungen
24. VI.	106	1800	6 „	5 „	

#### Zusammenfassung.

Bei 12 Kindern konnten in der Zeit der durch Injektion von Pferdeserum bei ihnen erzeugten Allergie nur zweimal im Serum Substanzen nachgewiesen werden, die beim Meerschweinchen anaphylaktische Symptome auslösten. Die Anwesenheit eines anaphylaktischen Reaktionskörpers ist daher bei heterologer Uebertragung nicht mit Sicherheit zu bestimmen.

Dieser Mißerfolg kann darin seine Erklärung finden, daß der beim Menschen auftretende Reaktionskörper in zu geringer Menge gebildet wird, oder darin, daß die heterologe passive Uebertragung zur Entscheidung nicht genügend empfindlich und daher nicht brauchbar ist.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem k. k. Serotherapeutischen Institute in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

**Ist die Temperatursteigerung als Kriterium bei der  
passiven Uebertragung der Tuberkuloseüberempfindlich-  
keit anzusehen?**

Von Regimentsarzt Dr. J. Novotný.

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. September 1909.)

Neuerlich wird von J. Bauer<sup>1)</sup> versucht, nachzuweisen, daß im Serum tuberkulöser Menschen anaphylaktische Reaktionskörper (Sensibiline) vorkommen, die auf Tiere passiv übertragbar sind und dieselben anaphylaktisch machen. Er injiziert normalen Meerschweinchen subkutan 2—3 ccm Blutserum eines tuberkulösen Menschen (Meerschweinchenserum), nach 24 Stunden injizierte er subkutan 0,125—0,2 ccm Alt-tuberkulin Koch und konnte bei den so vorbehandelten Tieren nach kürzester Zeit folgende Krankheitserscheinungen beobachten: Unruhe, Berührungsempfindlichkeit, das Fell sträubte sich, schließlich wurde das Tier matt und sank auf die Seite. Als meßbarer Ausdruck der Krankheit diente ihm die Temperaturkurve, die nach der Injektion von Tuberkulin gewöhnlich in den ersten Stunden blitzartig in die Höhe schnellte. Nach den an den Versuchstieren beobachteten Krankheitserscheinungen und der typischen Fieberreaktion will Bauer festgestellt haben, „daß wir in der Tuberkulinreaktion eine Ueberempfindlichkeitsreaktion vor uns haben, mit allen Anzeichen einer solchen, vor allem, daß es auch gelingt, die anaphylaktischen Reaktionskörper der Tuberkulösen passiv zu übertragen“.

Schon P. H. Römer und K. Joseph<sup>2)</sup> konnten sich überzeugen, daß die bloße Temperatursteigerung als Form der

1) J. Bauer, Die passive Uebertragung der Tuberkuloseüberempfindlichkeit. Münch. med. Wochenschr., 1909, No. 24.

2) P. H. Römer und K. Joseph, Prognose und Inkubationsstadium bei experimenteller Meerschweinchentuberkulose. Berl. klin. Wochenschr., 1909, No. 28.

Ueberempfindlichkeitsreaktion, wie wir sie diagnostisch beim Menschen und Rinde verwerten, beim Meerschweinchen zu höchst unzuverlässigen Resultaten führt, da die Meerschweinchen auch auf Injektionen indifferenter Flüssigkeiten sehr leicht mit Temperatursteigerungen antworten. H. Davidsohn und U. Friedemann<sup>1)</sup> haben untersucht, in welcher Weise die Temperaturkurve normaler und überempfindlicher Kaninchen durch Kochsalz verändert wird; zu dem Zweck wurden Kaninchen mit Rinderserum intravenös vorbehandelt und mit 0,6- bis 20-proz. Kochsalzlösung teils subkutan, teils intravenös reinjiziert; auf beiden Wegen wurde bei Kaninchen Fieber erzeugt. Aber sowohl subkutane als auch intravenöse Injektionen von Traubenzucker, arteigenem Blutserum, Ringer'scher Lösung riefen Fieber hervor.

H. Pfeiffer<sup>2)</sup> meint, daß der Temperatursturz ein charakteristisches und diagnostisch verwertbares Zeichen der Anaphylaxiereaktion bildet.

Ranzi<sup>3)</sup> Untersuchungen zeigen, daß peritoneale Injektion von normalen Seren einen Temperaturabfall um einen und mehr Grade bedingen. Allerdings sind die Temperaturabfälle bei anaphylaktischen Tieren größer als bei gesunden.

Inwieweit dem Phänomen des Temperaturanstieges bei der passiven Uebertragung der Anaphylaxie der Tuberkulose eine diagnostische Bedeutung zukommt, schien uns nicht von geringem Interesse zu sein und wurden daher hauptsächlich Kontrollversuche angestellt.

Normalen, gesunden Meerschweinchen wurden 2 ccm eines normalen Meerschweinchenserums, eines anaphylaktischen Meerschweinchenserums, eines anaphylaktischen Hundeserums, eines

---

1) H. Davidsohn und U. Friedemann, Untersuchungen über das Salzfeuer bei normalen und anaphylaktischen Kaninchen. Berl. klin. Wochenschr., 1909, No. 24.

2) H. Pfeiffer, Ueber den anaphylaktischen Temperatursturz und seine praktische Bedeutung. Aus den Sitzungsber. der Kais. Akad. der Wiss. in Wien, Bd. 118, Abt. III, 1909. — Derselbe: Ueber das verschiedene Verhalten der Körpertemperatur nach Injektionen und nach Reinjektionen von artfremdem Serum. Wien. klin. Wochenschr., 1909, No. 1.

3) E. Ranzi, Zur Frage des Nachweises eines spezifischen anaphylaktischen Reaktionskörpers im Blute von Tumorkranken. Wien. klin. Wochenschr., 1909, No. 210.

tuberkulösen Meerschweinchenserums, eines normalen und eines tuberkulösen Menschenserums injiziert, weiter aber auch 2 ccm Blutserum von verschiedenen normalen Tieren subkutan eingebracht und nach 24 bzw. 48 Stunden subkutan 0,2 ccm Alttuberkulin Koch injiziert. Die Temperatur wurde vor als auch nach der erfolgten Vorbehandlung gemessen: 1, 2, 4, 6 Stunden vor und 1, 2, 4, 6 Stunden nach der Tuberkulininjektion. Trat eine Fiebersteigerung ein, so war sie in diesen Versuchen auch zwischen der 2. und 3. Stunde nach der Reinjektion am deutlichsten ersichtlich. Hierzu die Tabelle.

Uebersieht man die Tabelle, so sieht man, daß

1) die normale Temperatur beim Meerschweinchen zwischen  $37,6-38,9^{\circ}$  sich bewegt,

2) nach subkutaner Vorbehandlung mit 2 ccm Normalmeerschweinchenserum und Reinjektion von 0,2 ccm Alttuberkulin Koch eine Temperaturerhöhung bis  $40,1-40,2^{\circ}$  eintritt (Z. 4, 5),

3) nach subkutaner Vorbehandlung mit tuberkulösem Meerschweinchenserum eine Temperatursteigerung von  $38,6^{\circ}$  auf  $39,6^{\circ}$  zu verzeichnen ist (Z. 8),

4) nach subkutaner Vorbehandlung mit normalem (sicher nicht tuberkulösem) Menschenserum die Reinjektion von 0,2 ccm Alttuberkulin eine Temperatursteigerung bis  $40,2-40,3-40,5^{\circ}$  verursachen kann (Z. 9, 10, 11), die

5) nach subkutaner Vorbehandlung mit tuberkulösem Menschenserum und Reinjektion von 0,2 ccm Alttuberkulin kaum erreicht wird (Z. 13, 14, 15), und daß

6) nach subkutaner Vorbehandlung mit Normalserum allein eine Steigerung zu beobachten ist ( $39,9^{\circ}$ ), die nach der Reinjektion von 0,2 ccm Alttuberkulin bis auf  $40,7-41^{\circ}$  hinaufsteigen kann (Z. 16—22).

Während der Beobachtungsdauer konnte man an den Versuchstieren keine Anaphylaxieerscheinungen konstatieren; die Tiere waren wohl kränklich, das Fell sträubte sich bei den meisten, aber sie boten kein Bild einer typischen anaphylaktischen Erkrankung. Das Tier Z. 17 war bereits nach der Seruminjektion schwer krank, hatte heftige Diarrhöen, die nach der Reinjektion mit Alttuberkulin noch zunahmen. Bei



[illegible]

Obduktion bot es keine tuberkulösen Veränderungen der Organe dar.

### **Zusammenfassung.**

Eine Temperatursteigerung nach subkutaner Injektion von Tuberkulin bei mit Serum von tuberkulösen Menschen vorbehandelten Meerschweinchen beweist nicht, daß im Serum ein anaphylaktischer Reaktionskörper vorhanden ist. Solche Temperatursteigerungen welche Bauer als spezifisch ansieht treten nach subkutaner Injektion von normalen Seris von Menschen und Tieren auf. Die mit normalen Seris subkutan vorbehandelte Meerschweinchen haben nach subkutaner Injektion von Tuberkulin auch erhöhte Temperaturen.

---

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut in Wien;  
Vorstand: Hofrat Prof. R. Paltauf.]

### **Zur Theorie Friedbergers über Anaphylaxie.**

Von Prof. R. Kraus und Dr. J. Novotný, k. k. Reg.-Arzt.

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. September 1909.)

In einer jüngst erschienenen Arbeit „Ueber Giftigkeit der Serumhämolyse“ haben wir uns damit beschäftigt, die Kriterien des anaphylaktischen Zustandes zu präzisieren und mußten gegen die Theorie Friedemanns Einwände erheben. Im folgenden gelangen wir dazu, auch die Theorie Friedbergers, welche Präzipitine als Ursache der Anaphylaxie ansieht, als unzureichend hinzustellen. Die Theorie Friedbergers setzt sich nicht bloß mit den bestehenden Tatsachen in Widerspruch, sie vermag auch die Tatsachen ohne Zuhilfenahme von Hilfshypothesen nicht zu erklären. Hier soll hauptsächlich gezeigt werden, daß die Tatsachen selbst die Theorie Friedbergers ad absurdum führen.

Friedberger will die Anaphylaxie in Zusammenhang mit Präzipitinen bringen. Nach Friedberger sollen aber

nicht freie, im Serum zirkulierende Präzipitine die Hauptrolle beim Zustandekommen des Phänomens spielen, sondern solche, die an den Zellen haften, sessil sind. „Sie sind es“, sagt Friedberger, „die das in jedem Falle toxisch wirkende artfremde Eiweiß, sofern es in genügender Menge verankert wird, an die Zellen binden.“

Auf Grund bekannter Tatsachen der gegebenen Literatur läßt sich bereits erwarten, daß die Annahmen Friedbergers nicht zur Erklärung der Anaphylaxie ausreichen. So wissen wir seit Bordet, daß Meerschweinchen schlecht Präzipitine zu bilden imstande sind; Uhlenhuth gelang es nur nach langdauernder Vorbehandlung präzipitierendes Serum von schwacher Wirksamkeit zu gewinnen. Und doch müssen wir das Meerschweinchen als das beste Versuchstier für Anaphylaxie bezeichnen<sup>1)</sup>.

Ferner wissen wir, daß es schon mittels einmaliger Injektion von 0,001 Serum gelingt, Meerschweinchen sicher zu sensibilisieren.

Trotzdem stellten wir noch den Versuch an, ob im Serum mit 0,001 vorbehandelter Meerschweinchen, die bei der Reinjektion typische anaphylaktische Erscheinungen dargeboten haben, Präzipitine nachweisbar sind. Es gelang weder direkt noch auf indirektem Wege mittels des Komplementablenkungsverfahrens nach Bordet-Gengou Präzipitine für Pferdeserum nachzuweisen (Tab. I).

Trotzdem also Präzipitine im Serum nicht vorhanden waren, sind die Meerschweinchen derart sensibilisiert, daß sie typisch nach Reinjektion mit Pferdeserum anaphylaktische Erscheinungen darbieten.

Friedberger sagt, daß die Hauptrolle die sessilen Präzipitine spielen. Es ist seit Otto bekannt und durch zahlreiche Versuche konnten wir uns davon überzeugen, daß das Serum sensibilisierter Meerschweinchen imstande ist, die Anaphylaxie auf gesunde Meerschweinchen zu übertragen. Im Serum sind keine

---

1) Auch Hunde geben nach eigenen Erfahrungen und denen Hamburgers nur sehr schlecht Präzipitine.

Tabelle I.

Präzipitationsversuche				Komplementbindungsversuche	Prüfung auf Anaphylaxie
Sensibil. Meerschw.	1,0 Pferdeser. 1:50	1,0 Pferdeser. 1:100	1,0 Pferdeser. 1:200		
Serum I. 0,1	+	+	+	I. 0,2 inakt. Meerschw.-Ser.	0,5 Pferdeser. intrav.
0,2	+	+	+	0,1 Pferdeser.	sofort Erscheinung +
„ II. 0,1	+	+	+	0,04 norm. Meerschw.-Ser.	0,5 Pferdeser. intrav.
0,2	+	+	+	0,02 Amboz. Hammelbl.	sofort Erscheinung +
„ III. 0,1	+	+	+	II. 0,2 inakt. Meerschw.-Ser.	1,0 Pferdeser. intrav.
0,2	+	+	+	0,1 Pferdeser.	schwer krank
„ IV. 0,1	+	+	+	0,04 norm. Meerschw.-Ser.	0,3 intravenös
0,2	+	+	+	0,02 Amboz. Hammelbl.	Erscheinungen
„ V. 0,1	+	+	+	III. 0,2 inakt. Meerschw.-Ser.	0,5 Pferdeser. intrav.
0,2	+	+	+	0,1 Pferdeser.	Erscheinungen
				0,04 norm. Meerschw.-Ser.	
				0,02 Amboz. Hammelbl.	
				IV. 0,2 inakt. Meerschw.-Ser.	
				0,1 Pferdeser.	
				0,04 norm. Meerschw.-Ser.	
				0,02 Amboz. Hammelbl.	

Präzipitine (mit unseren bisherigen feinsten Methoden nicht nachweisbar) und doch vermag das Serum passiv gesunde Meerschweinchen zu sensibilisieren.

Diese Tatsachen widersprechen der Theorie Friedbergers und müßten eigentlich genügen, sie im Widerspruch mit bestehenden Tatsachen als unrichtig hinstellen. Um aber noch weitere Beweise für die Unzulänglichkeit dieser Theorie zu erbringen, werden folgende Versuche angestellt.

Es wurden Kaninchen mit Hammelserum durch längere Zeit vorbehandelt, deren Serum, sobald es nachweisbar Präzipitine enthielt, auf gesunde Meerschweinchen übertragen. Die gesunden Meerschweinchen, welche 24 Stunden nach der Injektion des präzipitierenden Kaninchenserums mit normalem Hammelserum reinjiziert wurden, boten das Bild der typischen Anaphylaxie (Versuch I). Reinjektionen mit normalem Pferdeserum blieben ohne Wirkung. Daß es sich hier um typische spezifische Anaphylaxie handelt, geht noch aus weiteren Versuchen über Antianaphylaxie hervor. Mit Kaninchenimmunserum vorbehandelte Meerschweinchen werden nicht wie die ersteren im Versuch I intravenös reinjiziert, sondern

## Versuch I.

	Peritoneal-Serum von mit Hammelser. vorbehand. Kaninchen	Intravenöse Reinjektion nach 24 Std. norm. 1,0 Hammelserum
1) Meerschw.	1,0 Ser. Kan. 141	sofort Erscheinung
2) "	1,0 " " 134	" †
3) "	1,0 " " 14	" †
4) "	2,0 " " I	" †
Kontrolle	2,0 norm. Kaninchenser.	keinerlei Erscheinung
	4,0 " " "	
	2,0 Kaninchenimmunser.	1,0 "Pferdeser. intravenös keinerlei Erscheinungen

peritoneal. Die peritoneale Injektion, wie bekannt, löst zwar die Anaphylaxie aus, jedoch erst bei Verwendung viel größerer Serummengen und führt nicht immer zum Tode. Man kann also auf diese Weise bei sensibilisierten Tieren Anaphylaxie erzeugen und sie nachher auf Antianaphylaxie prüfen.

Es zeigte sich, daß die sensibilisierten, peritoneal mit Hammelserum reinjizierten Meerschweinchen nach neuerlicher intravenöser Reinjektion mit Hammelserum keinerlei anaphylaktische Symptome mehr darbieten, demnach anti-anaphylaktisch sind (Versuch II).

## Versuch II.

Gesundes Meerschw.	Vorbehandelt mit Kaninchen- immunserum	Nach 24 Stunden Reinjektion mit norm. Hammelser.	Nach 48 Stunden Reinjektion intravenös norm. Hammelser. 1,0
1	2,0 peritoneal	4,0 peritoneal	keinerlei Erscheinung
2	4,0 "	4,0 "	
Kontrolle	2,0 "	1,0 "Pferdeserum	sofort "Erscheinung †
	5,0 "	4,0 "	" " †

Friedberger würde in diesem Falle die im Kaninchen-serum nachgewiesenen Präzipitine als Ursache der durch Reinjektion ausgelösten Anaphylaxie ansehen und so die passive Anaphylaxie zu erklären versuchen. Daß es die Präzipitine aber nicht sein können, wie Friedberger meint, lehren folgende Versuche (III—VI). Es ist nicht gelungen, mit dem Kaninchenimmunserum gesunde Kaninchen (800 g) ebenso zu sensibilisieren wie Meerschweinchen. Trotzdem wir 4—10 ccm des präzipitierenden Kaninchen-serums Kaninchen peritoneal injiziert hatten, nach 24 Stunden

## Versuch III.

Mit Hammel- serum vorbeh. Kaninchen	0,1 Pferdeser.	0,2 Kanin- Serum	Versuch an Meerschweinchen	Versuch an Kaninchen
No. 14	1:50 1:100 1:200 1:600 1:1000 Pferde- serum	1:50 1:100 1:200 1:600 1:1000 Pferde- serum	1,0 perit. am 3. VIII. 1,0 Hammelser. am 4. VIII. intrav. sofort Erscheinung†	1) 4 Ser. 14 perit. 3. VIII. 2,0 Hammelserum 4. VIII. intrav. keinerlei Erschein. 2) 6,0 Ser. 14 perit. 3. VIII. 2,0 Hammelserum 4. VIII. intrav. keinerlei Erschein. 3) 10 Ser. 14 perit. 3. VIII. 2,0 Hammelserum 4. VIII. intrav. keinerlei Erschein.

## Versuch IV.

Mit Hammel- serum vorbeh. Kaninchen	0,1 Pferdeser.	0,2 Serum	Versuch an Meerschweinchen	Versuch an Kaninchen
No. 141	1:50 1:100 1:200 1:600 1:1000	1:50 1:100 1:200 1:600 1:1000	1,0 perit. Serum 141 am 3. VIII. 1,0 Hammelser. am 4. VIII. intrav. sofort Erscheinung	1) 4 Ser. 141 perit. am 3. VIII. 2,0 Hammelserum 4. VIII. intrav. keinerlei Erschein. 2) 7 Ser. 141 perit. am 3. VIII. 2,0 Hammelserum 4. VIII. intrav. keinerlei Erschein. 3) 10 Ser. 141 perit. am 3. VIII. 2,0 Hammelserum 4. VIII. intrav. keinerlei Erschein.

dann intravenös 1—2,0 ccm normales Hammelserum, gelang es in keinem einzigen Versuch, Anaphylaxie bei Kaninchen auszulösen. Dieselben präzipitierenden Sera sensibilisierten in Mengen von 1,0 sicher Meerschweinchen (250 g), vermochten aber in 4 bis 10 ccm großen Mengen Kaninchen nicht zu sensibilisieren.

Läßt sich der Ausgang dieser Versuche im Sinne Friedbergers erklären? Das homologe Serum sensibili-

## Versuch V.

Mit Hammel- serum vorbeh. Kaninchen	0,1 Pferdeser.	0,2 Serum	Versuch an Meerschweinchen	Versuch an Kaninchen
No. 134	1 : 50 1 : 100 1 : 200 1 : 600 1 : 1000	1 : 50 1 : 100 1 : 200 1 : 600 1 : 1000	Niedersch. 1,0 am 3. VIII. nach 24 Stunden 1,0 Hammelserum intravenös sofort Erscheinung †	1) 4,0 Ser. 134 am 3. VIII. 2,0 Hammelserum 4. VIII. intrav. keinerlei Erschein. 2) 6 Ser. 134 am 3. VIII. 2,0 Hammelserum 4. VIII. intrav. keinerlei Erschein. 3) 10 Ser. 13 am 3. VIII. 2,0 Hammelserum 4. VIII. intrav. keinerlei Erschein.

## Versuch VI.

Mit Hammel- serum vorbeh. Kaninchen	0,1 Pferdeser.	0,2 Serum	Versuch an Meerschweinchen	Versuch an Kaninchen
I	1 : 50 1 : 100 1 : 200 1 : 600 1 : 1000	1 : 30 1 : 100 1 : 200 1 : 600 1 : 1000	Niedersch. 2,0 perit. am 31. VIII. 1,0 Hammelser. am 1. VIII. sofort Erscheinung †	1) 4 Ser. K. I perit. 31. VII. 1,0 Hammelserum 1. VIII. intrav. keinerlei Erschein. 2) 4 Ser. K. I perit. 31. VII. 1,0 Hammelserum 1. VIII. intrav. keinerlei Erschein. 3) 7 Ser. K. I perit. 31. VII. 1,0 Hammelserum 1. VIII. intrav. keinerlei Erschein.

siert wohl heterologe Tiere, nicht die gleiche Tierart<sup>1)</sup>.

Sollten die Kaninchenpräzipitine nur von Meerschweinchenzellen gebunden werden können und nicht von den Zellen des artgleichen Tieres?

1) Eine soeben erschienene Arbeit Brauns (Münch. med. Wochenschr., 1909, No. 37) gelangt zu gleichen Resultaten. Auch Friedemann vermisst die passive Anaphylaxie bei Kaninchen. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 2, Heft 5.

Umgekehrt sahen wir in den vorangehenden Meerschweinchenversuchen, daß es gelingt, Meerschweinchen mit Meerschweinchen Serum zu sensibilisieren, nicht aber Kaninchen (s. auch Versuche von Schick und Novotný diese Zeitschrift).

Ganz gleiche Resultate, d. h. negative, erhielten wir bei passiver Uebertragung der präzipitierenden Kaninchenserum auf Ratten.

Sprechen nicht diese Versuche dagegen, daß die Präzipitine des Kaninchenimmunserums nichts mit der Anaphylaxie zu tun haben können und wohl andere Körper die Ursache der Sensibilisierung sein müssen?

Hier wäre noch zu bemerken, daß schon Otto in seiner bekannten Arbeit (Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 34) die anaphylaktischen Antikörper mit Präzipitinen nicht zu identifizieren vermochte. Hochgradige präzipitierende Sera wirkten nach Otto ebenso sensibilisierend wie solche, die keine Spur von Präzipitin enthalten. Auch Uhlenhuth zeigt, daß bei Hühnern, die wohl gute präzipitierende Sera liefern, Anaphylaxie nicht erzeugt werden könne. Diese Sera sind auch nicht imstande, passiv Meerschweinchen zu sensibilisieren. (Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, p. 293.)

Und zum Schluß noch einige Worte über eine Arbeit von Doerr und Russ, welche die Theorie Friedbergers zu stützen geeignet sein soll. Doerr und Russ versuchen es aus dem Nachweis des Präzipitins im Kaninchenimmunserum auf den Gehalt des Serums an Sensibilisin zu schließen. Die Autoren identifizieren Präzipitin mit Sensibilisin nicht nur aus quantitativen Verhältnissen, die sie finden, sondern hauptsächlich auf Grund des folgenden Versuches.

Es werden aktiv und passiv sensibilisierte Meerschweinchen intravenös mit Präzipitat (Kaninchenrinderserum + Rinderserum, Kaninchenhammelserum + Hammelserum), welches zentrifugiert und gewaschen wurde, reinjiziert.

Daraus nun, daß die vorbehandelten Meerschweinchen nach Reinjektion des Präzipitates Erscheinungen der Anaphylaxie darbieten (das Präzipitat war für gesunde Meerschweinchen nur in geringem Grade toxisch), schließen Doerr



und Russ, daß präzipitinogene Substanz identisch sein muß mit dem anaphylaktischen Antigen. In Konsequenz dieser Annahme muß demnach der anaphylaktische Immunkörper (Sensibilisin) identisch mit dem Präzipitin sein.

Daß diese Versuche richtig sind, daran ist nicht zu zweifeln, nur die Deutung dieser Versuche, und demnach die daraus gezogenen Schlüsse müssen eine Korrektur erfahren.

Durch die Versuche von Hamburger und Dehne, Sacharoff und eigene (Kraus und Pribram) wissen wir, daß durch Präzipitation Antigene des Serums und Immunkörper verschiedener Art (Antitoxin, Agglutinin) spezifisch gebunden werden kann. Namentlich haben unsere Versuche mit agglutinierenden Seris gezeigt, daß schon die Bindung des Präzipitinogens an das Präzipitin Ursache dieser Erscheinung sein kann.

Jacoby, Ehrlich und Marschall konnten bekanntlich zeigen, daß mehrere Antigene und Antikörper mit einer gemeinschaftlichen bindenden Gruppe im engsten Zusammenhang sein können.

Kraus und Pribram nahmen auf Grund der Versuche auch an, daß Immunkörper und Präzipitinogen eine gemeinschaftliche bindende Gruppe haben müssen.

Gleiches läßt sich wohl auch für die Versuche von Doerr und Russ annehmen. Präzipitinogen und Sensibilisinogen bzw. Antisensibilisin hängen in engster Beziehung zusammen, so wie beispielsweise Agglutinin und Präzipitinogen, und werden deshalb durch Präzipitin gefällt. Injiziert man nun das Präzipitat (Präzipitin + Präzipitinogen) aktiv oder passiv sensibilisierten Tieren, injiziert man gleichzeitig Antisensibilisin und löst die Erscheinungen der Anaphylaxie aus.

Eine Identität des Präzipitinogens mit dem Antisensibilisin (anaphylaktisches Antigen) aus diesen Versuchen abzuleiten, ist nicht ausreichend. Wie die Angaben der Literatur lehren, sind derartige Verbindungen von Antikörpern mit Antigenen oder der Antikörper untereinander im Serum experimentell bewiesen. Präzipitin mit Sensibilisin auf Grund des Ausfalles dieser Versuche als identisch anzusehen, ist daher

auch nicht zulässig. Dazu kommt aber noch, daß die vorangehenden Versuche direkt gegen diese Annahme sprechen. Die Meerschweinchen haben kein Präzipitin im Serum und sind typisch sensibilisiert mit Pferdeserum. Das mit Hammelserum vorbehandelte Kaninchenserum, das Präzipitin enthält, vermag nur Meerschweinchen zu sensibilisieren, nicht aber Kaninchen, Ratten.

Damit glauben wir dargetan zu haben, daß auch die Versuche von Doerr und Russ nicht geeignet sind, die Theorie Friedbergers zu stützen. Diese Versuche beweisen nur, daß das Präzipitinogen und Antisensibilisin miteinander derart verbunden sind, daß durch Präzipitin beide Körper in den Niederschlag gelangen.

Und auch die jüngst veröffentlichten Versuche von Friedberger und Hartoch über den Komplementschwund bei anaphylaktischen Tieren können zur Erklärung der Präzipitintheorie nicht herangezogen werden, da ja die Komplementbindung verschiedene Ursachen haben dürfte. Dazu kommt aber noch, daß Michaelis und Fleischmann bei Kaninchen trotz Präzipitingehaltes des Serums durch Reinjektion keine merkliche Anaphylaxie und Abnahme des Komplementgehaltes nachweisen konnten. (Mediz. Klinik, 1906, No. 1.)

#### Zusammenfassung.

1) Sensibilisierte Meerschweinchen müssen im Serum kein nachweisbares Präzipitin haben und können trotzdem bei der Reinjektion typische Erscheinungen der Anaphylaxie darbieten.

2) Das Serum sensibilisierter Meerschweinchen, welches kein Präzipitin enthält, vermag gesunde Meerschweinchen zu sensibilisieren.

3) Serum von Kaninchen, die mit Hammelserum vorbehandelt sind und wirksames Präzipitin enthalten, sensibilisiert Meerschweinchen, nicht Kaninchen, Ratten.

4) Aus diesen Tatsachen läßt sich direkt ableiten, daß Sensibilisin und Präzipitin nicht identische Körper sein können.

5) Nach den Versuchen von Doerr und Russ haben Präzipitinogen des Serums und Antisensibilisin eine gemeinschaftliche bindende Gruppe. Präzipitin fällt auch Antisensibilisin.

Diese Versuche lassen ohne weiteres den Schluß zu, daß Präzipitine nicht die Ursache der anaphylaktischen Vergiftung sein können. Die Präzipitintheorie Friedbergers wird durch diese Versuche nicht gestützt.

#### **Literatur.**

- Kraus, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 3.  
Friedemann, U., ebenda, Bd. 2.  
Friedberger, ebenda, Bd. 2.  
Doerr u. Russ, ebenda, Bd. 3.  
Hamburger u. Dehne, Wien. klin. Wochenschr., 1904.  
Sacharoff, Centralbl. f. Bakt., 1905.  
Kraus u. Pribram, ebenda, 1905.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin;  
Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Im-  
munitätsforschung und experimentelle Therapie, Leiter: Prof.  
Dr. E. Friedberger).]

#### **Weitere Mitteilung über Anaphylaxie.**

##### **III.**

**Erwiderung auf die vorstehende Arbeit von Kraus  
und Novotný:**

**„Zur Theorie Friedbergers über Anaphylaxie“.**

**Von E. Friedberger.**

**Mit Tafel III.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 24. September 1909.)

In der vorstehenden Arbeit versuchen die Verfasser die Theorie Friedbergers durch ihre Versuche „ad absurdum zu führen“. Das lebenswürdige Entgegenkommen meines hochverehrten Kollegen Kraus ermöglicht es mir, schon auf Grund des Manuskripts Stellung zu dieser Arbeit zu nehmen.

Kraus und Novotný stützen ihr Urteil auf zwei Gruppen von Versuchen:

1) Sie weisen darauf hin, daß das Serum des anaphylaktisch gemachten Meerschweinchens kein freies Präzipitin enthält, aber trotzdem imstande ist, die Anaphylaxie passiv auf andere Meerschweinchen zu übertragen.

2) Das präzipitierende Serum eines Kaninchens, das zur passiven Anaphylaktisierung eines Meerschweinchens sehr geeignet ist, soll nicht imstande sein, die Anaphylaxie passiv auch auf das artgleiche Tier zu übertragen.

Die ersteren Versuche sind ja nicht neu, sondern allen Forschern, die sich mit dem Anaphylaxieproblem beschäftigt haben, längst geläufig. Wenn Kraus und Novotný diese Versuche als Gegenargument gegen meine Theorie anführen, so haben sie offenbar meine Ausführungen über den Antagonismus zwischen freien und sessilen Antikörpern übersehen oder mißverstanden; denn ich habe gerade derartige Verhältnisse als eine wesentliche Stütze für meine Theorie angesehen.

Die Folgerungen, zu denen Kraus und Novotný in der zweiten Gruppe von Versuchen kommen, sind falsch, weil sie auf einer ungenügenden Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse beruhen.

Beides soll in Nachstehendem des näheren auseinandergesetzt werden.

Ich beginne mit der zweiten Gruppe von Versuchen; denn gerade das Verhalten des Kaninchens liefert uns einen Schlüssel zum Verständnis der gänzlich abweichenden Verhältnisse beim Meerschweinchen.

Weil Kraus und Novotný in mehreren Versuchen mit einem am Meerschweinchen wirksamen Antihammelkaninchen-serum keine passive Anaphylaxie beim Kaninchen erzeugen konnten, so schließen sie, „daß Sensibilisin und Präzipitin nicht identische Körper sein können“.

Wenn die Autoren aber vorher erst einmal die quantitativen Verhältnisse der aktiven und passiven Anaphylaxie beim Kaninchen namentlich bezüglich der Reinjektionsdosis näher studiert hätten, so wären sie sicherlich zu ganz anderen Ergebnissen gekommen.

Das Kaninchen verhält sich nämlich, was Kraus und Novotný unbekannt zu sein scheint, bezüglich der Ana-

phylaxie ganz anders wie das Meerschweinchen (vergl. auch Braun). Das gilt sowohl für die aktive wie für die passive Ueberempfindlichkeit. Während es durch Vorbehandlung mit kleinsten Dosen von Eiweiß so gut wie konstant gelingt, Meerschweinchen aktiv anaphylaktisch zu machen, ist bei analoger Vorbehandlung beim Kaninchen eine aktive deutliche Anaphylaxie nur schwer zu erzielen. Mit Dosen von 1—2 ccm pro Kilo Tier, die, auf das Gewicht des Meerschweinchens berechnet, dort sicher letal wirken, gelingt es nur relativ selten, schwere anaphylaktische Symptome oder Anaphylaxietod auszulösen. Größere Serumdosen, 2—3 ccm, die das native Tier ohne weiteres verträgt, wirken schon besser, aber auch keineswegs konstant.

Günstiger werden die Resultate beim Kaninchen dann, wenn man das Immunisierungsschema wählt, das Friedemann für die Blutkörperchenanaphylaxie empfohlen hat, d. h. 14 Tage bis 4 Wochen nach der ersten Injektion eine zweite präparierende intravenöse Injektion mit einer Dosis anschließt, die nicht selten leichte Krankheitssymptome (Mattigkeit, Dyspnoë), aber so gut wie nie schwere Anaphylaxie und Exitus zur Folge hat (1—2 ccm).

Durch eine dritte 8 Tage später erfolgende intravenöse Injektion einer größeren Serummengende kann man dann typische anaphylaktische Symptome und den Tod in vielen Fällen herbeiführen. Aber selbst bei dieser forcierten Vorbehandlung sind zur Auslösung der Anaphylaxie Dosen des Eiweißes notwendig, die im Vergleich zu den beim Meerschweinchen erforderlichen als sehr hohe bezeichnet werden müssen (3—5 ccm). Auch mit diesen Dosen aber kommen die Tiere noch häufig davon.

Ein viel feineres Reagens nun als die subjektive Beobachtung der zwar deutlichen, aber vielfach doch nur im Verhältnis zu den beim Meerschweinchen leichten Symptome ist das Auftreten der typischen Kurvenbilder bei der Registrierung von Puls und Atmung. Doch auch um die deutliche Drucksenkung nur einigermaßen konstant zu erhalten, sind bei genügender Präparierung schon Dosen von 3 ccm intravenös pro Kilo Tier für die auslösende Injektion erforderlich.

Derartige Versuche zeigen bereits, daß das Kaninchen im Gegensatz zum Meerschweinchen zwar kein sehr geeignetes

Versuchstier für die Anaphylaxie darstellt, daß aber bei dieser Tierspecies gleichwohl die Anaphylaxie erzeugt werden kann.

Die gleichen quantitativen Bedingungen gelten nun auch für die passive Anaphylaxie. Wie das mit kleinen Dosen aktiv anaphylaktisierbare Meerschweinchen auch leicht passiv anaphylaktisch zu machen ist, so gelingt bei dem nur mit großen Dosen aktiv anaphylaktisierbaren Kaninchen auch die Auslösung der passiven Anaphylaxie nur mit relativ großen Dosen des Reinjektionsserums.

Man kann gerade bei der passiven Anaphylaxie sehr exakt die Differenz in der Empfindlichkeit beider Tierspecies messen, wenn man mit gleichen Dosen Antieiweißserum (auf das Körpergewicht berechnet) die Tiere intraperitoneal vorbehandelt und 24 Stunden später die gerade krankmachende oder tödliche Dosis des entsprechenden Antigens reinjiziert. Mit einem Antihammelkaninchenserum, das bis zur Verdünnung  $\frac{1}{10\,000}$  Hammelserum sofort präzipitierte, wurden eine Anzahl Kaninchen und Meerschweinchen mit der gleichen Dosis (2,0 pro Kilo Tier) vorbehandelt. Die Dosis, die bei der Reinjektion beim Meerschweinchen noch deutliche Krankheitssymptome auslöste und nach starkem Temperaturabfall den Tod innerhalb 12 Stunden herbeiführte, betrug 5 mg pro Kilo Tier. Um annähernd entsprechende Symptome beim Kaninchen zu erzielen (Mattigkeit, Dyspnoe, Temperaturabfall, Tod in 12—18 Stunden), waren 2,0 Hammelserum pro Kilo Tier erforderlich. Danach zeigte sich, daß unter analogen Versuchsbedingungen das Meerschweinchen etwa 400mal empfänglicher ist als das Kaninchen. In jeder Weise ist also das Kaninchen weniger empfindlich.

Haben Kraus und Novotný auf diese Verhältnisse gebührende Rücksicht genommen? Sehen wir uns daraufhin die Dosierung bei ihren Versuchen näher an. Ueber den Präzipitationswert der von ihnen angewandten Sera finden wir in der Arbeit nichts; er dürfte kaum sehr hoch gewesen sein, denn die Autoren begnügten sich mit einem Serum, „sobald es nachweisbar Präzipitine enthielt“. Die verwandten Antieiweißsera sind auch nicht einmal am Meerschweinchen, das doch als Vergleichstier dient, ausgewertet worden, und ebenso-

wenig ist das Reinjektionsserum für eine konstante Dosis Präzipitin titriert worden. Wir wissen also gar nicht, ob beim Meerschweinchen, das mit 1—2 ccm der einzelnen Sera intraperitoneal vorbehandelt war, die reinjizierte Dosis Hammelserum von 1 ccm nicht schon die Grenzdosis darstellte oder wenigstens ihr nahe kam. Aber auch wenn das nicht der Fall wäre, so war natürlich mit den von Kraus und Novotný in ihren Kaninchenversuchen (Tiere von 800 g) zur Reinjektion benutzten Dosen von 1—2 ccm Hammelserum bei der geringeren Empfänglichkeit des Kaninchens von vornherein kein deutliches Resultat zu erwarten; denn diese Dosen entsprechen, auf das Körpergewicht berechnet, nicht einmal denen, die sie bei den so viel empfänglicheren Meerschweinchen gegeben haben. Hätten Kraus und Novotný, anstatt sich mit dieser einen Dosis zu begnügen, bei Verwendung eines wirksamen präzipitierenden Serums größere Dosen des Reinjektionsserums gegeben, so wären sie zu ganz anderen Resultaten gelangt. Daraus, daß die gleichen oder sogar noch kleinere (!) Dosen als die beim Meerschweinchen wirksamen beim Kaninchen versagen, folgern zu wollen, das Kaninchen ist unempfindlich, wäre dasselbe, als wenn jemand behaupten wollte, das Kaninchen ist refraktär gegenüber dem Tetanustoxin, bloß, weil Dosen, die eine Maus töten, auf das Körpergewicht berechnet, die andere Tierart kaum krank machen. Kraus und Novotný sind also dadurch, daß sie die ganz verschiedene Empfänglichkeit der beiden Tierarten für die Anaphylaxie gar nicht berücksichtigt haben, zu absolut falschen Schlüssen gekommen. Ein refraktärer Zustand des Kaninchens gegenüber der passiven Vorbehandlung mit Kaninchenantiserum existiert tatsächlich nicht, und die Argumentation, die die Autoren daraus gegen meine Theorie herleiten, ist hinfällig. Ich führe als Beispiel einige Versuche an, in denen ich gleichfalls mit Kaninchenantihammelserum Kaninchen deutlich passiv anaphylaktisch zu machen vermochte, wobei ich freilich unter Verwendung eines

stark präzipitierenden und am Meerschweinchen als hochwirksam erkannten präzipitierenden Serums viel größere Dosen zur Reinjektion verwandte als Kraus.

Zur Präparierung wurde das Serum des Kaninchens No. 64 (Antihammelserum) benutzt. Ueber die Behandlung des Tieres und den Wert des Serums sind die näheren Angaben in meiner Arbeit mit Hartoch im vorigen Heft dieser Zeitschrift zu finden.

#### I. Versuch.

5. VIII. Kaninchen No. 7, 850 g, erhält 1,0 Serum Kaninchen 64 intraperitoneal.
6. VIII. 2mal kurz hintereinander je 4,0 Hammelserum in die Ohrvene. Man sieht eine jedesmalige deutliche Beeinflussung des Pulses, doch ist die Wirkung nur sehr gering.

Dies ist offenbar an der ungenügenden Dosis des präparierenden Serums gelegen, denn die Wirkung ist schon deutlicher in dem folgenden Versuch, in dem zur Präparierung eine größere Menge des Serums 64 verwendet wurde, obwohl die Reinjektionsdosis hinter der vorigen zurückblieb.

#### II. Versuch.

3. VIII. Kaninchen No. 84, 1300 g, erhält 3,0 Serum Kaninchen 64 intraperitoneal.
4. VIII. 3,0 Hammelserum in die Ohrvene. Deutliche Drucksenkung; aber auch hier erholt sich das Tier bald.

Ganz anders aber ist das Bild, wenn bei etwa gleicher Vorbehandlung größere Dosen zur Reinjektion verwandt wurden.

#### III. Versuch.

5. VIII. Kaninchen No. 6, 1150 g, erhält 2,5 Serum Kaninchen 64 intraperitoneal.
6. VIII. 5,0 Hammelserum in die Ohrvene. Sehr starke Vaguspulse; deutliche Beeinflussung von Blutdruck und Atmung. Das Tier erholt sich später wieder. (Kurve 1.)

Zur Demonstration der völligen Analogie der beim Kaninchen erhaltenen Kurvenbilder mit denen beim Meerschweinchen lasse ich einen Versuch an dieser Species folgen, bei dem ein Tier ausnahmsweise gleichfalls noch gerade mit dem Leben davontkam.



## IV. Versuch.

6. VIII. Meerschweinchen No. 13, 650 g, 3,0 Serum Kaninchen 64 intra-peritoneal.  
7. VIII. 1,2 Hammelserum in die Vena jugularis. Die Kurve ist ganz analog der in Versuch 3. (Kurve 2.)

Bei größeren Dosen des Reinjektionsserums gelingt es auch beim passiv anaphylaktisch gemachten Kaninchen, nicht nur deutliche Symptome, sondern auch den Tod herbeizuführen, wie der folgende Versuch zeigt.

## V. Versuch.

4. VIII. Kaninchen No. 91, 1120 g, erhält 3,0 Serum Kaninchen 64 intra-peritoneal.  
5. VIII. 6,0 Hammelserum intravenös. Typische Drucksenkung, Atemstillstand, Tod. (Kurve 3.)

Im Gegensatz zu Kraus und Novotný ist es uns also gelungen, auch auf das Kaninchen die Anaphylaxie durch ein Antieiweißkaninchenserum zu übertragen.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß bezüglich der passiven Anaphylaxie durch die Präparierung mit Kaninchenantieiweißserum zwischen Kaninchen und Meerschweinchen kein qualitativer, sondern nur ein quantitativer, durch die verschiedene Empfänglichkeit der beiden Tierspecies bedingter Unterschied besteht.

Gerade das abweichende Verhalten des Kaninchens im Vergleich zum Meerschweinchen ist auf Grund meiner Theorie ungezwungen zu erklären, und damit komme ich zur zweiten Gruppe der Kraus'schen Versuche, denen am Meerschweinchen, bei denen Kraus und Novotný meine Deutung nicht genügend berücksichtigen. Das Kaninchen, mit artfremdem Eiweiß behandelt, bildet sehr leicht Präzipitine, die in die Blutbahn abgestoßen werden. Das Meerschweinchen dagegen erzeugt nur sehr geringe Mengen freien Präzipitins, Mengen, die bei der üblichen Art der Präparierung weit unter der Grenze des Wahrnehmbaren bleiben. Daraus erklärt sich zwanglos die hohe Empfänglichkeit des Meerschweinchens, die geringe des Kaninchens für die aktive Anaphylaxie. Sie beruht eben auf dem Antagonismus zwischen freien und sessilen Antieiweiß-

körpern, wie ich das bereits im allgemeinen in meiner ersten Arbeit auseinandergesetzt habe. Beim Kaninchen, bei dem soviel freies Präzipitin im Körper zirkuliert, gelingt, weil dieses das reinjizierte Antigen abfängt, die Auslösung der Anaphylaxie nur unvollkommen und nur mit großen Dosen des Reinjektionsserums; ganz anders beim Meerschweinchen, bei dem nicht in gleicher Weise durch den zirkulierenden Antikörper das Antigen von der Fixierung an die Zellen ferngehalten wird.

War diese Vorstellung richtig, so mußte es gelingen, beim Meerschweinchen durch Zufuhr reichlicher Mengen präzipitierenden Serums kurz vor der Reinjektion mit dem Antigen die Anaphylaxie zu verhüten, indem dann das im Ueberschuß im Blut zirkulierende Antiserum das nachgespritzte Antigen abfängt und so vor dem deletär wirkenden Zugang zu den Zellen fernhält. In der Tat ist es mir einige Male geglückt, sowohl bei aktiv wie bei passiv anaphylaktischen Tieren den erwarteten Erfolg zu erzielen bei Reinjektionsdosen, die in den zahlreichen Kontrollversuchen stets tödlich wirkten. Da ich aber unter einer großen Reihe von Versuchen dieses Ergebnis nur relativ selten zu verzeichnen hatte, während in anderen Fällen die mit großen Dosen präzipitierenden Serums behandelten Tiere sich ganz wie die Kontrollen verhielten, so möchte ich gleichwohl bei der Deutung dieser Versuche die größte Zurückhaltung bewahren. Die Tiere, bei denen die akute Anaphylaxie auf die angegebene Weise verhütet wurde, gingen übrigens ausnahmslos in 12—18 Stunden ein.

Also nicht „trotzdem“, wie Kraus und Novotný sagen, sondern gerade weil oft nicht soviel Präzipitin im Serum vorhanden ist, daß wir es durch die üblichen Reaktionen nachweisen können, ist das Meerschweinchen soviel empfänglicher in bezug auf die aktive Anaphylaxie als das Kaninchen.

Bei der passiven Anaphylaxie müssen wir analoge Verhältnisse annehmen. Hier ist nicht so sehr der absolute Gehalt des Wirtserums an Antikörpern für die Uebertragungsmöglichkeit maßgebend, als vielmehr die Affinität der Zelle für den Antikörper bei der zu präparierenden Species, d. h. also deren Empfänglichkeit. Das Kaninchen, das seine aktiv gebildeten Antikörper so leicht abgibt, hat ein Serum, das zur

passiven Uebertragung auf empfindliche Species sehr geeignet ist. Es selbst aber verankert auch passiv offenbar nur relativ langsam und wenig. Daher gelingt die Auslösung der passiven Anaphylaxie 24 Stunden nach der Vorbehandlung nur schwer. Aber sie gelingt gleichwohl, wie meine obigen Versuche darthun, sicher, wenn man nur dementsprechend genügend große Dosen des Reinjektionsserums verwendet.

Dagegen ist offenbar die Avidität der Meerschweinchenzelle, die ja auch den aktiv gebildeten Eiweißantikörper festhält, für die passiv zugeführten so viel größer, daß selbst Sera zur Präparierung ausreichen, in denen die vorhandenen Mengen des Antikörpers durch die Präzipitation und Komplementablenkung nicht mehr zu erkennen sind.

Seine Existenz aber deshalb leugnen zu wollen, weil die Menge so gering ist, daß sie nicht mit unseren üblichen Reagenzglasmethoden, sondern nur im Tierexperiment (passive Anaphylaxie am hochempfindlichen Tier, Meerschweinchen) nachweisbar sind, das wäre etwa dasselbe, als wenn man das Vorhandensein eines belebten Erregers bei gewissen Krankheiten deshalb leugnen wollte, weil er nur durch den Tierversuch erkennbar und nicht mikroskopisch sichtbar zu machen ist.

Vielleicht spielt bezüglich des verschiedenen Verhaltens des Kaninchens zum Meerschweinchen sowohl bei der aktiven wie bei der passiven Anaphylaxie auch der Umstand eine Rolle, daß das Produkt der gegenseitigen Einwirkung von Eiweiß und Antieiß beim Meerschweinchen giftiger wirkt, als beim Kaninchen. Wenn wir auf Grund der regelmäßigen Komplementverarmung bei der Anaphylaxie daran gedacht haben, daß erst durch die Komplementverankerung das toxische Agens aus der Verbindung Eiweiß-Antieiß abgespalten wird, so wäre schon in dem reichen Komplementgehalt des Meerschweinchen-serums im Vergleich zu dem Kaninchen eine weitere Erklärung für das verschiedene Verhalten der beiden Tierspecies gegeben.

Auch gegen diese Komplementverarmungsversuche erheben Kraus und Novotný allerdings Einwände. Sie sagen, daß die jüngst veröffentlichten Versuche von Friedberger über den Komplementschwund bei anaphylaktischen Tieren zur

Erklärung der Präzipitintheorie nicht herangezogen werden können, „da ja die Komplementverankerung verschiedene Ursachen haben dürfte“.

Welches nun die von ihnen vermuteten „verschiedenen Ursachen“ sind, die die Komplementbindung „haben dürfte“, darüber machen Kraus und Novotný leider keine näheren Angaben.

Sie berufen sich nur noch auf eine Arbeit von Fleischmann und Michaelis, die „bei Kaninchen trotz Präzipitin-gehaltes des Serums durch Reinjektion keine merkliche Anaphylaxie und Abnahme des Komplementgehaltes nachweisen konnten (Mediz. Klinik, 1906, No. 1)“.

Ganz abgesehen davon, daß unsere Hunderte von Versuchen an Meerschweinchen diese Komplementverankerung unzweideutig dartun, Versuche, die von mir und anderen auch an weiteren Tierspecies inzwischen bestätigt sind, ist mir die Berufung von Kraus und Novotný auf Fleischmann und Michaelis auch deshalb unverständlich, weil die Arbeit gerade das Gegenteil von dem enthält, was Kraus und Novotný angeben. Die unzutreffenden Angaben der beiden Autoren veranlassen mich, die fraglichen Stellen aus der Arbeit von Fleischmann und Michaelis zu zitieren:

„Von besonderem Interesse schien es uns nun aber, zu prüfen, ob eine ähnliche Komplementbindung im Tierkörper stattfinden kann, wenn sich in ihm Präzipitin und präzipitable Substanz mischen.

---

Unsere Versuche erstrecken sich also darauf, festzustellen, ob bei der im Tierkörper vor sich gehenden Bindung der beiden Substanzen das im Blut enthaltene Komplement verschwindet. Dies konnten unsere Versuche tatsächlich dartun<sup>1)</sup>.

Wir injizierten einem mit Rinderserum mehrere Monate intraperitoneal vorbehandelten Kaninchen, welches ein sehr starkes Präzipitin erworben hatte, in die Ohrvene 2 ccm Rinderserum. Wir entnahmen sowohl vor der Injektion, wie 2 Stunden danach eine Blutprobe aus der Ohrvene und gewannen daraus das Serum; das Tier zeigte die schon von anderen Autoren längst mit Sicherheit festgestellte eigentümliche Ueberempfindlichkeit gegen Rinderserum. Während bei einem nicht vorbehandelten Kontrolltier eine Injektion von 2 ccm Rinderserum in die Ohrvene ohne Störung vertragen wurde, zeigte das Präzipitintier nach der Injektion alsbald Krankheitserscheinungen und starb nach 18 Stunden.

---

1) Im Original nicht gesperrt.

Es wurden nun verglichen bezüglich ihres Komplementgehaltes:

Serum 1: Das Serum des Präzipitintieres vor der Injektion;

Serum 2: Das Serum dieses Tieres 2 Stunden nach der Injektion von Rinderserum;

Serum 3: Das Serum eines Normaltieres vor der Injektion und

Serum 4: Dasselbe nach der Injektion.

Wir benutzten diese Sera als Komplement für eine Mischung von je 1 ccm einer 5-proz. Aufschwemmung von peinlichst gewaschenen Meerschweinchenblutkörperchen, mit 0,05 ccm eines sehr hochwertigen, gegen Meerschweinchenblutkörperchen hämolytischen Kaninchenserums. Dabei zeigte sich, daß das Serum No. 1 die normale Komplementmenge enthält, wie sie uns durch Vergleich mit Serum No. 3 gegeben wird; auch das Serum No. 4 zeigte normalen Komplementgehalt. Dagegen enthält Serum No. 2 absolut kein Komplement<sup>1)</sup>.

Ja sogar bei einer Vermischung von 1,0 Meerschweinchenblut + 0,2 (!) Ambozeptor + 0,7 (!!) des fraglichen Serums als Komplement trat nach 2-stündigem Stehen und wiederholtem Umschütteln bei 38° keine Spur einer Hämolyse ein.

Das Schwinden des Komplements in vivo wurde von uns bisher nur in so krassen Fällen beobachtet, wo stark präzipitinhaltige Tiere mit relativ großen Mengen der präzipitablen Substanz direkt im Blutgefäßsystem überschwemmt wurden. Daß aber auch in weniger extremen Fällen ein Einfluß auf den Komplementgehalt des Blutes besteht, scheint uns sehr wahrscheinlich<sup>1)</sup>. Wir sind mit der diesbezüglichen Erweiterung der Versuche noch beschäftigt.“

Ich bin nun in der Lage, heute weitere Versuche beizubringen, die meine in der vorigen Arbeit mit Hartoch ausgesprochene Vermutung, „daß die Komplementverankerung mit der Anaphylaxie im engsten Zusammenhang stehen soll, und daß das verankerte Komplement seinerseits erst den Vergiftungsprozeß auslöst“, beweisen. Wenn nämlich diese Annahme richtig war, so mußte bei der Digerierung von Präzipitaten in vitro mit komplementhaltigem Meerschweinchen-serum die giftige Substanz in Lösung gehen, genau wie es Friedemann bei der Blutkörperchenanaphylaxie beobachtet hat<sup>2)</sup>. Das ist tatsächlich der Fall. Durch Zusatz von frischem Normalmeerschweinchen-serum zu sorgfältig gewaschenem Präzipitat wird in einigen Stunden so viel Gift gebildet, daß

1) Im Original nicht gesperrt.

2) Bei der Eiweißanaphylaxie ist ihm dieser Nachweis wohl deshalb nicht geglückt, weil er seine Versuche am Kaninchen, also einer wenig geeigneten Tierspecies, angestellt hat.

das abzentrifugierte, vom Präzipitat völlig befreite artgleiche (!) Serum beim normalen Meerschweinchen schwere anaphylaktische Erscheinungen erzeugt, wenn auch die Symptome weniger intensiv sind wie bei der gewöhnlichen Anaphylaxie.

Damit erscheint es mir bewiesen, daß das Komplement tatsächlich bei der Anaphylaxie eine wesentliche Rolle spielt<sup>1)</sup>. Und auch für meine Versuche mit Hartoch über die Verhütung der Anaphylaxie durch Salzinjektion dürfte damit die Richtigkeit unserer Erklärung bewiesen sein, daß diese prophylaktische Wirkung nur auf der Verhütung der Komplementverankerung beruht.

Ich habe bereits in meiner ersten Arbeit über Anaphylaxie (Bd. 2 dieser Zeitschrift) aus der gesamten Literatur den völligen Parallelismus im Verhalten des „anaphylaktischen Reaktionskörpers“ mit dem Eiweißantikörper nachgewiesen und zum ersten Male ausgesprochen, daß wir hier nur verschiedene Erscheinungsformen eines und desselben Antikörpers vor uns haben.

Das haben auch die Versuche von Doerr und Russ über den völligen Parallelismus zwischen Präzipitingehalt eines Serums und sogenanntem „Reaktionskörper“ völlig bestätigt, und Braun hat in jüngster Zeit weiteres Beweismaterial in dieser Richtung geliefert. Ohne in ihre Erwiderung auf die Versuche von Doerr und Russ in diesem Zusammenhang einzugehen, berufen sich nun Kraus und Novotný einzig auf die Arbeit von Otto, nach der „hochgradige präzipitierende Sera ebenso sensibilisierend wirkten, wie solche, die keine Spur von Präzipitin enthalten“. Von einer „ebenso“ guten Wir-

1) Der Reagenzglasversuch mit dem giftig wirkenden Komplementserum zeigt, daß die Giftbildung wohl auch im Organismus nicht ausschließlich an den Zellen erfolgt, wie das ja von vornherein nicht anders zu erwarten war.

Daß aber gleichwohl bei der gewöhnlichen Versuchsanordnung der an den Zellen sich abspielende Vergiftungsprozeß für das Zustandekommen des typischen Symptomenbildes vorwiegend verantwortlich zu machen ist, dafür spricht die Tatsache, daß Meerschweinchenserum, auch wenn es längere Zeit mit großen Mengen von Präzipitat zusammen war, nie eine so stürmische Vergiftung hervorruft, wie wir sie sonst bei der aktiven und passiven Anaphylaxie sehen.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. III.

48

kung ist aber in der Arbeit von Otto keineswegs die Rede. Er konstatiert nur (Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 34, p. 1668), daß die anaphylaktisierenden Antikörper „sowohl in hochwertigen präzipitierenden Seris vorkommen, als auch in solchen, die keine Spur von Präzipitin enthalten“. Das wissen wir aber auch aus den Versuchen von Doerr und Russ, nur daß bei der von diesen vorgenommenen quantitativen Auswertung gleichwohl die Experimente notgedrungen zu ganz anderen Ergebnissen führen und den völligen Parallelismus zwischen „Reaktionskörper“ und Antieiweißkörper dartun.

Nachdem durch diese Arbeit also unter Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse die Resultate von Otto in ganz anderem Lichte sich darstellen, erscheint es zum mindesten bedenklich, bei der Diskussion der vorliegenden Frage diejenige Arbeit ganz außer acht zu lassen, die eine wesentliche Erweiterung der Ottoschen Befunde bedeutet, und durch die dessen Schlüsse als überholt zu betrachten sind.

Ueber die Ursache der Unmöglichkeit der passiven Anaphylaxierung von Meerschweinchen durch Antieiweißserum vom Huhn (Uhlenhuth und Haendel), die Kraus und Novotný gegen meine Theorie anführen, habe ich mich bereits in der vorigen Arbeit und auch in der Berliner klin. Wochenschrift (1909, No. 36) ausführlich ausgesprochen. Kraus und Novotný berücksichtigten allerdings auch diese Ausführungen nicht. Inzwischen ist es mir aber auch hier gelungen, den Beweis für die an der angegebenen Stelle ausgesprochene Vermutung zu erbringen. Es werden Vögel (Tauben) tatsächlich durch Präparierung mit Antieiweißserum von der Ente passiv für Hammelserum anaphylaktisch.

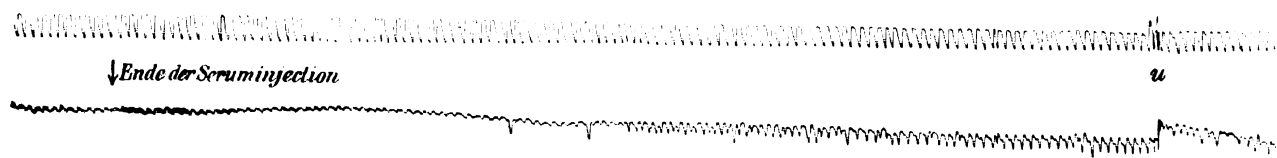
#### Zusammenfassung.

Die vorstehenden Ausführungen zeigen, daß die Angriffe von Kraus und Novotný der tatsächlichen Berechtigung entbehren.

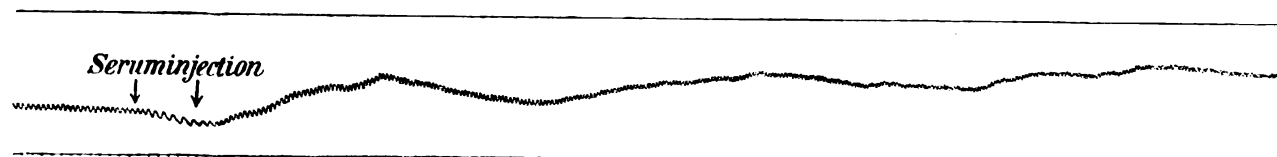
Das verschiedene Verhalten der Kaninchen und Meerschweinchen bei der passiven Anaphylaxie findet in der verschiedenen Empfänglichkeit der beiden Tierspecies seine voll-



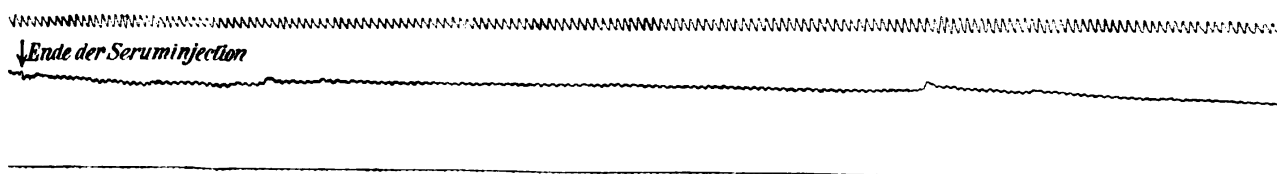




Kurve 1 (passiv anaphylaktisch)



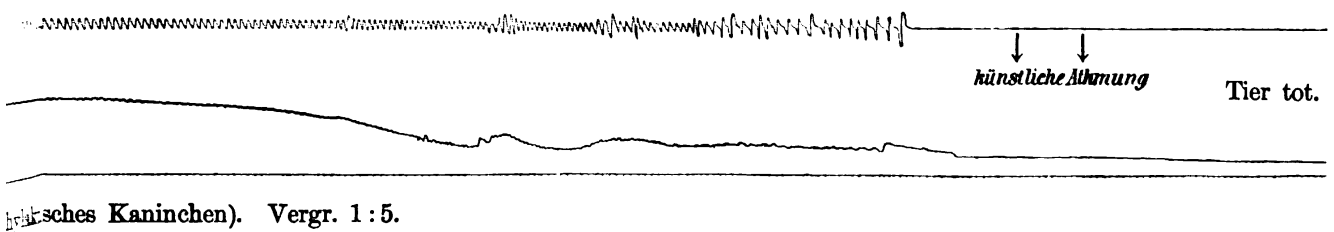
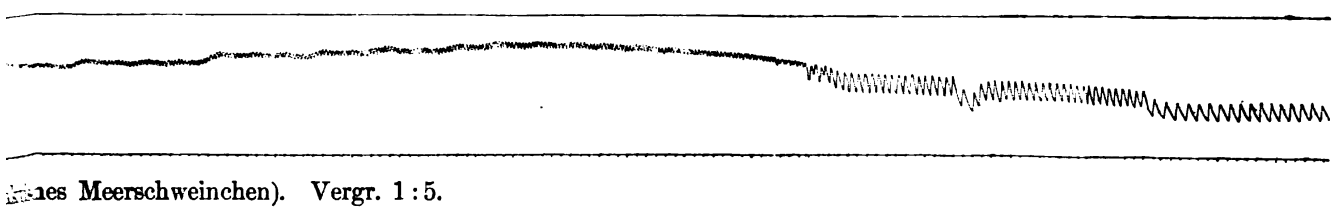
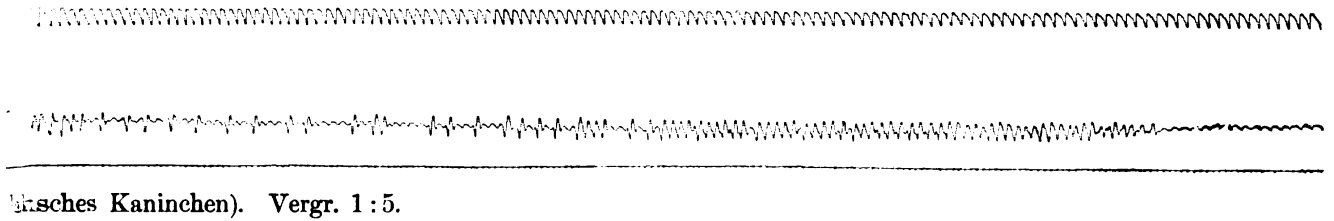
Kurve 2 (passiv anaphylaktisch)



Kurve 3 (passiv anaphylaktisch)

Friedberger, Weitere Mitteilung über Anaphylaxie.

*Tafel III.*



Verlag von Gustav Fischer in Jena.



kommene Erklärung. Es ist unrichtig, daß, wie Kraus und Novotný annehmen, das Kaninchen überhaupt nicht passiv mit präzipitiertem Serum anaphylaktisierbar ist. Die falschen Schlüsse von Kraus und Novotný sind darauf zurückzuführen, daß die quantitativen Verhältnisse in der Anaphylaxie des Kaninchens von den beiden Autoren gänzlich außer acht gelassen worden sind.

Mit diesen Ausführungen erscheinen mir auch die Einwände erledigt, die die beiden Autoren gegen die Deutung der Versuche von Doerr und Russ erhoben haben, welchen die Erzeugung der Ueberempfindlichkeit mit Präzipitaten gelang. Man bedarf keineswegs der von Kraus und Novotný gemachten Hilfhypothese, daß in den Präzipitaten ein besonderer anaphylaktischer Reaktionskörper niedergerissen werde.

Nach allem ist also meine Theorie von der Identität des anaphylaktischen Reaktionskörpers mit dem Eiweiß-Antikörper nicht erschüttert.

Ich möchte meine Theorie, die sich ja ganz auf die seither vorliegenden Tatsachen gründet und in jüngster Zeit, besonders durch die Versuche von Doerr und Russ, Braun und meine eigenen, neue experimentelle Stützen erfahren hat, gleichwohl nur als eine reine Arbeitshypothese betrachtet sehen. Inwieweit die Theorie tatsächliche Existenzberechtigung hat, werden wohl die weiteren Studien auf diesem Gebiet, auf dem wir ja noch in den ersten Anfängen stehen, zweifellos dartun. Hier galt es mir nur zu beweisen, daß sie weder durch die Versuche von Kraus und Novotný, noch durch deren theoretische Ausführungen „ad absurdum geführt ist“.

*Nachdruck verboten.*

[Aus dem Bakteriologischen Laboratorium des k. und k. Militär-sanitätskomitees in Wien.]

### **Studien über Anaphylaxie.**

#### **IV.**

Von Privatdozent **R. Doerr** und Privatdozent **V. K. Russ.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 4. Oktober 1909.)

#### **I.**

Zunächst müssen wir hier nochmals etwas ausführlicher auf eine Frage zurückkommen, die uns in dieser Zeitschrift (2. Bd., 1. Heft) schon einmal beschäftigt hat. Es handelt sich um die bekannte Theorie von Besredka, wonach die anaphylaktisierende Substanz (Sensibilisinogen) artfremder Sera von jenem Körper abzutrennen sei, der bei der Reinjektion toxisch wirkt und Antianaphylaxie erzeugt (sogenanntes Anti-sensibilisin).

Wir wiesen a. a. O. darauf hin, wie außerordentlich gezwungen die Annahme ist, daß ein Antigen einen Immunkörper bildet, der dann nicht mit ihm, sondern mit einer ganz anderen, zufällig in den Antigenlösungen (im Serum) präformierten Substanz spezifisch reagiert, und konnten in zahlreichen Versuchen dartun, daß sowohl durch Erhitzen als durch fraktionierte Fällung der Sera immer nur Eiweißmodifikationen erzielt werden, bei denen sich — quantitative Untersuchungsmethoden vorausgesetzt — das Sensibilisierungsvermögen, die Toxizität und die Fähigkeit, Antianaphylaxie hervorzurufen, in völligem Parallelismus befinden. Danach sind alle diese Eigenschaften notwendigerweise Funktionen desselben Antigens, des spezifischen Eiweißmoleküls. Mit anderen Worten ausgedrückt: Injiziert man artfremdes Eiweiß einem normalen Tier, so produzieren die Gewebe desselben den anaphylaktischen Immunkörper, das Tier wird überempfindlich; injiziert man dasselbe Antigen dem überempfindlichen Individuum, so tritt es mit dem Immunkörper in Reaktion (anaphylaktischer Shock)

und ist diese Reaktion **völlig** abgelaufen, so muß das Tier, falls es überlebt, unempfindlich, antianaphylaktisch sein, eine neuerliche Antigenezufuhr kann nicht mehr wirken, weil eben freier Immunkörper nicht mehr zur Disposition steht. Diese Auffassung hat nicht nur den Vorzug der Einfachheit für sich, sie befindet sich auch im besten Einklang mit den herrschenden Vorstellungen über den Mechanismus anderer Immunitätsprozesse, wie dies Friedberger in seiner „Kritik der Theorien über die Anaphylaxie“ ausführlich auseinandergesetzt hat.

Unsere Versuche, auf chemischem Wege die Identität des anaphylaktisierenden Antigens mit der sogenannten toxischen Substanz zu erweisen, blieben bisher unwidersprochen. Dagegen haben Kraus und Volk gegen die zweite Hälfte unserer Beweisführung, wonach durch Erhitzen von Eiweißlösungen die beiden genannten Eigenschaften gleichmäßig abgeschwächt werden, Stellung genommen; sie glauben in früheren und neueren Experimenten eine Stütze für Besredkas Hypothese gefunden zu haben, derzufolge sensibilisierendes Vermögen und Toxizität auf Grund der verschiedenen Thermoresistenz verschiedenen Substraten zugeschrieben werden müssen.

Wir vermögen aber in den Versuchen der genannten Autoren nur eine vollinhaltliche Bestätigung für unsere Behauptung zu erblicken.

Wir haben nämlich gezeigt, daß schon beim normalen, unerhitzten Serum ganz enorme Differenzen zwischen jenen Dosen bestehen, welche die Tiere überempfindlich machen, und jenen Mengen, die toxisch wirken, d. h. noch geeignet sind, bei der intravenösen Reinjektion krankhafte Symptome zu provozieren. Wie schon Rosenau und Anderson angeben, kann man Meerschweinchen bereits mit 0,0001 und 0,00001 ccm Pferdeserum sicher sensibilisieren und stimmen unsere Erfahrungen beim Rinderserum<sup>1)</sup> damit überein. Anderer-

1) Kraus und Volk meinen, wir hätten mit solchen minimalen Quantitäten nicht immer Erfolg gehabt, und verweisen auf ein Protokoll III unserer Arbeit. Aus dieser Versuchsserie geht aber, wie im erläuternden Text auseinandergesetzt wird, nur hervor, daß wir bei derart vorbehandelten Tieren den anaphylaktischen Shock bloß dann ausbleiben sahen, wenn die intravenöse Reinjektion nach zu kurzer Zeit erfolgte, daß aber nach längerem Intervall ebenso hochgradige Anaphylaxie eintritt, wie bei den mit größeren Serummengen (0,001 und darüber) sensibilisierten Meerschweinchen.

seits haben wir als kleinste Dosis Rinderserum, die bei intravenöser Reinjektion noch deutliche anaphylaktische Symptome auslöst, 0,008—0,01 ccm festgestellt, woraus sich also ergibt, daß vom unerhitzten Serum 1200—1000 mal mehr erforderlich ist, um toxische Wirkungen beim hypersensiblen Tier zu erzielen, als um den Ictus immunisatorius beim normalen Tier zu setzen. Wir sagten uns daher, daß wir nur dann ein Recht hätten, von einem abweichenden Verhalten der antigenen und der toxischen Fähigkeiten **erhitzter** Sera zu sprechen, wenn die beim **unerhitzten** Serum gefundenen Differenzen erheblich vergrößert wären, oder wenn es gelänge zu zeigen, daß eine bestimmte Quantität erhitzten Serums noch sensibilisiert, während ihr 1000-faches Multiplum völlig atoxisch ist.

Es stellte sich aber heraus, daß 0,01 ccm eines Serums, das auf 90—100° C erhitzt war, absolut nicht imstande ist, zu sensibilisieren, daß also das antigene Vermögen eine ganz beträchtliche Abschwächung (ziffernmäßig ausgedrückt um das Tausendfache) erfahren hatte. Damit ist aber die Frage in unserem Sinne entschieden; denn findet man nun, daß auch die Toxizität dieser erhitzten Sera so reduziert ist, daß selbst 2—5 ccm<sup>1)</sup> nicht mehr anaphylaktische Symptome auslösen, so beweist dies eben, daß Antigen und toxische Substanz ganz gleichmäßig alteriert sind, und es entfällt der Grund, sie in materiellem Sinne voneinander abzugrenzen.

Kraus und Volk finden nun auf Grund eigener Versuche, daß 0,01 ccm eines auf 90—100° erhitzten Serums tatsächlich nicht mehr sensibilisiert, daß dementsprechend auf 96° erhitzte Sera auch in Mengen von 2—5 ccm nicht toxisch wirken, und wir hätten daher von ihrer Seite eher Zustimmung als Widerspruch erwartet.

Die Tatsache, daß noch höhere Dosen, 0,05—0,1 ccm erhitzten Serums (90—100° C) sensibilisieren (Kraus und Volk)<sup>2)</sup>, ist sehr interessant und forensisch (Uhlenhuth), vielleicht auch theoretisch für die Spezifität der Koktoserä

1) Das 200—500-fache der Dosis toxica minim. von unerhitztem Serum.

2) Wir haben die Erscheinung nie nachgeprüft, wie Kraus und Volk irrtümlich angeben, und fehlt in unseren Arbeiten jeder Hinweis darauf.

(Pick und seine Mitarbeiter) wichtig; zur Begründung der Hypothese Besredkas könnte sie jedoch nur dann herangezogen werden, wenn es möglich wäre, zu zeigen, daß 50 bis 100 ccm erhitzten Serums, einem anaphylaktischen Meer-schweinchen intravenös injiziert, nicht tödlich, ja nicht einmal imstande sind, schwere Symptome auszulösen<sup>1)</sup>. Das ist natürlich technisch unmöglich und auch völlig überflüssig, da im Bereiche der niederen Dosen der Beweis für die gleichmäßige Abschwächung stark erhitzter Sera ohnehin erbracht ist. Daß übrigens diese stark erhitzten Sera nicht völlig atoxisch für überempfindliche Tiere sind, zeigt ein Versuch von Kraus und Volk, wo ein offenbar individuell stärker hypersensibles Meer-schweinchen auf die Reinjektion von 5 ccm erhitzten Rinder-serums (96° durch 20°) sofort verendete, sowie die Beobachtung, daß Hunde schon auf geringe Dosen erhitzten Serums (20 bis 30 ccm) manchmal typische Blutdrucksenkung bekamen. Der anaphylaktische Shock ist eben kein sehr feines Reagens für die Toxizität; die Blutdrucksenkung (und der Pfeiffersche Temperatursturz?) sind viel empfindlicher.

Erhitzt man ein Serum nicht auf 90, sondern nur auf 80° C, so werden übrigens die Verhältnisse noch klarer. Jetzt sensi-

---

1) Ein Beispiel aus der Chemie mag das Gesagte noch besser illustrieren: Pepton läßt sich sowohl mit Kupfer- als mit Nickelsalzen (durch die Biuretreaktion) nachweisen. Die Kupferprobe ist jedoch viel empfindlicher als die Nickelprobe und mit fortschreitender Verdünnung einer Pepton-lösung kommt man schließlich zu Konzentrationen, welche mit Cu noch positiv, mit Ni schon negativ reagieren. Deswegen wird es aber niemandem einfallen, zu behaupten, daß Pepton aus zwei Substanzen besteht, von welchen die eine mit Cu, die andere mit Ni nachweisbar ist. Genau so verhält es sich mit dem spezifischen Eiweißantigen im Serum; auch für dieses gibt es zwei Methoden des Nachweises, eine empfindlichere, durch Sensibilisieren eines Normaltieres, und eine gröbere, durch Prüfung der Toxizität für das hypersensible Tier. Erhitzt man das Serum, so wird das Antigen vermindert, ist in kleinen Mengen Serum überhaupt nicht, in großen nur mit der empfindlichen Probe zu finden. Wie unberechtigt es ist, daraufhin ein thermostabiles Sensibilisinogen und einen thermolabilen toxischen Körper anzunehmen, kann jedermann erfahren, der ein natives, unerhitztes Serum einfach 10000fach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt; jetzt sensibilisiert 1 ccm der Verdünnung auch noch, aber nicht einmal 10 ccm wirken toxisch, weil eben zu wenig Antigen da ist.



bilisiert 0,01 ccm, aber nicht wie die gleiche Menge unerhitzten Serums, sondern erst nach langer Inkubation, also etwa wie 0,0001 unerhitztes Serum. Das antigene Vermögen ist also ca. hundertfach herabgesetzt; dementsprechend ist auch die Toxizität etwa hundertfach geringer als beim Normalserum, es wirkt nicht 0,01, sondern erst 1,0 oder mehr, wie folgender Versuch lehrt:

A. Meerschweinchen, sensibilisiert mit je 0,01 ccm erhitzten Rinderserums (80° durch 20°) und nach verschiedenen Intervallen mit 0,2 ccm unerhitzten Serums intravenös reinjiziert:

	Intervall	Resultat der Reinjektion
Meerschw. 444	10 Tage	θ
„ 445	20 „	θ
„ 446	30 „	schwerste Symptome
„ 447	30 „	† 5'

B. Meerschweinchen, mit 0,01 Normalserum vorbehandelt und mit erhitztem Rinderserum (80° durch 20°) intravenös reinjiziert:

	Intervall	Menge des injizierten erhitzten Serums	
Meerschw. 317	10 Tage	0,4 ccm	θ
„ 319	13 „	2,5 „	† in 5'

Es zeigt also das Sensibilisinogen schon bei niederen Temperaturen (80° C) eine unverkennbare, der Abnahme der Toxizität parallele Abschwächung, was mit Besredkas Theorie unvereinbar ist.

Endlich führen Kraus und Volk gegen uns noch folgendes Phänomen an: „Erhitztes Serum erzeugt keine Antianaphylaxie, nur nicht erhitztes Serum hat Antianaphylaxie zur Folge.“ Das Ausbleiben der Antianaphylaxie wäre nach diesen Autoren als Beweis für das Nichtvorhandensein des Sensibilisins (der toxischen Substanz) im erhitzten Serum anzusehen. Der obige Satz stellt aber, abgesehen davon, daß er in dieser allgemeinen Fassung nicht richtig ist (siehe unten), eine bloße Umschreibung der Tatsache dar, daß im stark erhitzten Serum die Toxizität stark reduziert ist; eine Eiweißlösung, die wenig toxisch ist, kann natürlich auch nicht leicht antianaphylaktisch machen. Wenn wir einem überempfindlichen Tier das betreffende Eiweiß reinjizieren, so tritt der sessile

Immunkörper mit dem neu einverleibten Antigen in Reaktion; die Intensität dieser Reaktion, deren sichtbarer Ausdruck die anaphylaktischen Symptome sind und an der wir die Toxizität der injizierten Eiweißlösung messen, hängt natürlich von dem gegenseitigen Mengenverhältnis der reagierenden Körper ab. Nehmen wir an, es wäre eine bestimmte ausreichende Menge Immunkörper im Organismus vorhanden und wir injizieren soviel Antigen, als zur Absättigung ausreicht, so wird das Tier intensiv reagieren, wir sagen, die injizierte Flüssigkeit war toxisch; überlebt das Individuum, so ist es gegen die neuerliche Antigenezufuhr geschützt, weil es keinen reaktionsfähigen Antikörper mehr hat und heißt dann antianaphylaktisch. Injizieren wir aber zu wenig Antigen oder, was im Wesen das Gleiche ist, durch Erhitzen abgeschwächtes, so wird nur ein Teil des Immunkörpers abgesättigt werden; ist dieser sehr klein, so zeigt das Tier keine Symptome, wir nennen das einverleibte Material atoxisch, das Tier bleibt, da es noch viel unbesetzten Immunkörper hat, weiter empfindlich, die sog. Antianaphylaxie ist also ausgeblieben.

Es bleibt also die Antianaphylaxie auch aus, wenn man **nicht erhitztes** Serum empfindlichen Meerschweinchen injiziert, vorausgesetzt, daß die Mengen hinreichend klein sind, ja man kann mühelos verfolgen, wie mit fallenden Mengen die Antianaphylaxie, d. h. die Absättigung des Immunkörpers durch die erste Injektion immer unvollständiger wird, z. B.

Mit 0,01 ccm Rinderserum sensibilisierte Meerschweinchen, nach 14 Tagen mit unerhitztem Serum das erstmal, nach weiteren 24 Stunden das zweitemal intravenös reinjiziert:

I. Reinjektion			II. Reinjektion (Antianaphylaxie)		
No.	Menge	Resultat	Menge	Resultat	
200	0,02 ccm	schwere Symptome	0,1 ccm	⊖	
201	0,015 "	" "	0,1 "	schwere Symptome	
202	0,01 "	" "	0,1 "	+ 5'	
203	0,005 "	deutliche "	0,1 "	+ 8'	
Oder der gleiche Versuch mit Pferdeserum:					
208	0,04 ccm	+ 5'	—	—	
209	0,02 "	schwere Symptome	0,2 ccm	⊖	
211	0,01 "	deutliche "	0,2 "	⊖	
210	0,005 "	⊖	0,2 "	schwere Symptome	

Oder abermals mit Pferdeserum, jedoch nicht mit Vollserum, sondern mit den Globulinen:

I. Injektion			II. Injektion		
No.	Menge	Resultat	Menge	Resultat	
711	0,2 ccm	† in 2'	—	—	
715	0,1 „	† in 30'	—	—	
720	0,08 „	schwere Symptome	0,2 ccm	⊕	
722	0,04 „	„ „	0,2 „	deutliche Symptome	
723	0,02 „	deutliche „	0,2 „	schw. Sympt., † in 4'	
724	0,01 „	leichte „	0,2 „	„ „ † in 2'	

In unseren früheren Arbeiten findet sich eine ganze Menge derartiger Versuche, die zeigen, wie Toxizität und die Fähigkeit, Antianaphylaxie zu erzeugen, immer voneinander abhängig sind. Auch bei fraktioniertem Aussalzen werden immer Eiweißlösungen erhalten, die um so eher antianaphylaktisch machen, je toxischer sie sind, je näher sie also den Globulinen stehen.

Besonders möchten wir nur auf die Tiere 201, 202, 203, 722, 723 und 724 aufmerksam machen, die zweimal reagiert haben, als Beispiele für die Möglichkeit, den Immunkörper in zwei Etappen derart abzusättigen, daß die Reaktion jedesmal für eine Shockwirkung ausreicht.

Bei stark (auf 96° C z. B.) erhitzten Serumproben wird es uns daher nicht wunder nehmen, wenn sie selbst in großen Dosen nicht antianaphylaktisch machen; sie sind ja auch nicht in dem Sinne toxisch, daß die Tiere mit Symptomen reagieren. Der die Ueberempfindlichkeit bedingende Immunkörper wird auch durch erhebliche Mengen derart erhitzter Sera nur zum geringsten Teile abgesättigt; deshalb zeigen die Tiere nichts Auffälliges und deshalb bleiben sie auch überempfindlich. Es wäre aber gefehlt, anzunehmen, daß dem erhitzten Serum die Fähigkeit (Sensibilisin) **völlig** fehlt, mit dem Immunkörper zu reagieren; das läßt sich durch einen sehr einfachen Kunstgriff zeigen. Man nimmt nicht aktiv, sondern passiv anaphylaktische Meerschweinchen, injiziert ihnen intravenös erhitzte Sera und prüft dann auf Antianaphylaxie mit unerhitztem Vollserum. Da zeigt sich die Reduktion des Immunkörpers durch die Injektion des erhitzten Serums sofort, weil man es eben besser in Händen hat, durch die passive Versuchsanordnung nur so viel Immunkörper dem Tier zuzuführen, daß eine wenn auch geringe Verminderung desselben ihren

experimentellen Ausdruck bei der Prüfung auf Antianaphylaxie findet.

**Versuch.** Alle Meerschweinchen dieser Reihe bekamen am 15. IX. 1,0 ccm Serum von Kaninchen 477 (Antihammelserum) intraperitoneal; am 16. IX. und 17. IX. wurden sie sämtlich mit Hammelserum intravenös reinjiziert.

No.	I. Injektion (rechte Jugularis)		II. Injektion (Prüfung auf Anti-anaphylaxie mit 0,2 ccm unerhitztem Hammelserum in die linke Jugularis)	
	Art des injizierten Serums	Menge		
100	unerhitzt	0,1 ccm	† 5'	—
101	"	0,05 "	† 5'	—
102	"	0,025 "	schwere Sympt.	leichteste Symptome?
103	"	0,01 "	θ	θ
104	"	0,01 "	θ	θ
105	auf 60° 2 <sup>a</sup>	0,1 "	† 5'	—
106	"	0,05 "	† 5'	—
107	"	0,025 "	† 5'	—
108	"	0,01 "	θ	schwere Symptome
109	auf 70° 1 <sup>a</sup>	0,5 "	schwere Sympt.	θ
110	"	0,25 "	θ	θ
111	auf 80° 1 <sup>a</sup>	1,0 "	deutl. Sympt.	θ
112	"	0,5 "	" "	schwere Symptome
113	auf 90° 1 <sup>a</sup>	1,0 "	θ	θ

Es zeigt sich aus vorstehendem Protokoll deutlich, daß die Meerschweinchen 108—113, bei denen eine Injektion von erhitztem Serum stattgefunden hatte, entweder gar nicht oder viel schwächer auf 0,2 Hammelserum reagierten, als die Kontrollen 100 und 101, welche nur die Hälfte resp. das Viertel dieser Menge erhielten, daß also wohl der Immunkörper total oder partiell durch das erhitzte Serum abgesättigt sein mußte.

Das erhitzte Serum enthält also auch geringe Mengen der toxischen (antianaphylaktisch machenden) Substanz entsprechend seiner im Verhältnis zum Normalserum minimalen antigenen Fähigkeit.

## II.

Die folgenden Experimente beabsichtigen, der von Friedberger und uns aufgestellten und bearbeiteten Präzipitintheorie neues Beweismaterial zuzutragen.

Nach dieser Theorie ist das anaphylaktische Antigen oder, wie man auch sagen kann, das spezifische Eiweiß, identisch mit der präzipitablen Substanz, der anaphylaktische Immun-

körper wesensgleich mit dem Präzipitin und der anaphylaktische Shock der Ausdruck einer Vergiftung, die dann erfolgt, wenn sich der sessile, an den Organzellen verankerte Immunkörper mit reinjiziertem Antigen verbindet. Die Plötzlichkeit der Symptome erklärt sich daraus, daß die giftige Verbindung infolge der Avidität ihrer beiden Komponenten momentan zustande kommt, wie ja auch hochwertiges Präzipitin mit präzipitabilem Eiweiß in vitro sofort reagiert; da andererseits eine Giftkomponente bereits mit empfindlichen Zellen in Kontakt steht, so muß sich die Beeinflussung der letzteren schon nach kürzester Zeit und sehr intensiv äußern. Anders liegt die Sache, wenn man das Gift in vitro herstellt, indem man Präzipitin und präzipitable Substanz aufeinander wirken läßt, und das Produkt, das Präzipitat, einem normalen Tier injiziert. Man beobachtet zwar auch toxische, und zwar typisch anaphylaktische Erscheinungen (Doerr und Russ, Friedemann); sie treten jedoch erst nach einer Inkubation von mehreren Minuten auf und sind nie so heftig, als man dies sonst zu sehen gewohnt ist; dies liegt daran, daß die Verankerung des Präzipitins an die Zellen nur sehr langsam erfolgt, zwar nach kurzer Zeit beginnt, aber erst in etwa 4 Stunden (Doerr und Russ) nennenswerte Grade erreicht, wodurch bedingt ist, daß das fertige Gift nur unvollständig und allmählich an den empfindlichen Apparat herantritt, was in dem weniger stürmischen Ablauf der Intoxikationsphänomene seinen Ausdruck findet.

Diese Auffassung konnten wir nun durch neue Versuche stützen.

Vor allem gelang der Nachweis, daß auch beim erhitzten Serum die Präzipitabilität und der Gehalt an toxischer Substanz (Antigen) in engsten Beziehungen stehen, wie dies Doerr und Russ schon für unerhitzte Sera und aus denselben durch Aussalzen gewonnene Eiweißfraktionen bewiesen.

#### Versuch.

Hammelserum wurde mit 3 Teilen Aq. dest. verdünnt, unter allen Kautelen auf 60° C durch 2 Stunden, auf 70° C durch 1 Stunde, auf 80°

durch 1 Stunde, auf 90° durch 20 Minuten und auf 100° durch 15 Minuten erhitzt und geprüft:

A. Auf den Gehalt an präzipitabler Substanz, indem von den verschieden erhitzten Proben, sowie von Normalserum in der üblichen Weise Verdünnungen hergestellt, je 1,0 ccm mit 0,1 Antihammelserum (von Kaninchen 477) versetzt und 2 Stunden bei 37° C belassen wurde. Das abgelesene Resultat zeigt folgende Tabelle:

Ver- dünnung	un- erhitzt	Art des Serums				
		auf 60° 2 <sup>h</sup>	auf 70° 1 <sup>h</sup>	auf 80° 1 <sup>h</sup>	auf 90° 20'	auf 100° 15'
100	+++	+++	+++	+	θ	θ
200	+++	+++	+++	+		
500	+++	+++	++	+		
750	+++	+++	++	θ		
1000	+++	+++	++			
1250	+++	+++	+			
1500	+++	+++	θ			
1750	+++	+++				
2000	+++	+++				
2250	+++	++				
2500	+++	+				
2750	+++	+				
3000	+++	+				
3500	+++	θ				
4000	+++					

+++ bedeutet reichlichen Niederschlag, ++ suspendierte Flocken, + Trübung, θ Klarbleiben der Probe.

B. Auf den Gehalt an toxischer Substanz. Meerschweinchen erhielten am 15. IX. je 1,0 Serum 477 intraperitoneal, nach 20 Stunden wurden sie intravenös mit normalem, sowie mit verschieden erhitztem Hammelserum reinjiziert. Sie reagierten, wie folgt:

Auf normales Hammelserum:

Meerschw. 100	0,1 ccm intrav.	+ 5'
" 101	0,05 " "	+ 5'
" 102	0,025 " "	schwere Symptome
" 103	0,01 " "	θ
" 104	0,01 " "	θ

Auf Hammelserum, erhitzt auf 60° durch 2 Stunden:

Meerschw. 105	0,1 ccm intrav.	+ 5'
" 106	0,05 " "	+ 3'
" 107	0,025 " "	+ 5'
" 108	0,01 " "	θ

Auf Hammelserum, erhitzt auf 70° durch 1 Stunde:

Meerschw. 109	0,5 ccm intrav.	schwere Symptome
" 110	0,25 " "	θ

Auf Hammelserum, erhitzt auf 80° durch 1 Stunde:

Meerschw. 111	1,0 ccm intrav.	deutliche Symptome
" 112	0,5 " "	" "

Auf Hammelserum, erhitzt auf 90° durch 20 Minuten:

Meerschw. 113	1,0 ccm intrav.	θ
---------------	-----------------	---

Dann hat uns aber auch die Frage beschäftigt, ob man nicht in der Lage ist, die Identität von Präzipitin und anaphylaktischem Immunkörper weiter sicherzustellen. Bisher war der von Doerr und Russ erbrachte Nachweis, daß Kaninchen bei der Immunisierung mit artfremdem Eiweiß Immunsera liefern, in denen der Gehalt an Präzipitin und anaphylaktischem Immunkörper parallel geht, die einzige experimentelle Stütze dieser Annahme, und es haben sich auf dem XVI. internationalen medizinischen Kongreß zu Budapest Stimmen erhoben, welche gegen die Beweiskraft dieses einen Momentes sprachen.

So hat insbesondere Neufeld betont, daß der zeitliche Ablauf der anaphylaktischen Vorgänge von dem der anderen Immunitätsprozesse abweicht. Das gilt aber weder für die Ausbildung der aktiven Anaphylaxie, noch für das Auftreten und Verschwinden des anaphylaktischen Immunkörpers im Blute.

Wenn man ein Tier mit irgendeinem Antigen vorbehandelt, so vergeht ein 4—6 $\frac{1}{2}$  Tage währendes Latenzstadium, bevor sich ein Zustand der Immunität entwickelt, der dann zwischen 9. und 11. Tag ein Maximum erreicht.

Genau so verhalten sich aber Meerschweinchen, denen man ein einziges Mal Eiweißantigen injiziert, in Bezug auf die sich entwickelnde Ueberempfindlichkeit.

Meerschweinchen, sämtlich subkutan sensibilisiert mit 0,01 ccm Rinderserum und mit 0,2 ccm Rinderserum iv. reinjiziert:

nach Ablauf von	Resultat
4 Tagen	Ø
5 "	leichte Symptome
6 "	Ø
6 "	leichte Symptome
6 $\frac{1}{2}$ "	† in 2'
7 "	Ø
7 "	leichte Symptome
8 "	schwere Symptome
8 "	† 5'
8 "	† 4'
9 "	† 5'
9 "	† 3'
9 "	† 3'
10 "	† 5'
10 "	† 5'
10 "	† 5'

Ebenso sieht man, daß die Gesetze, welche v. Dungern für das Auftreten der Antikörper, speziell der Präzipitine im Blutserum ermittelt hat, auch für den anaphylaktischen Immunkörper gelten. Während es nach der ersten Injektion 8 Tage braucht (Otto), bevor der anaphylaktische Immunkörper nachweisbar wird, kürzt sich bei wiederholter Injektion diese Latenzperiode wesentlich ab; wir haben bei unserer letzten Arbeit den Aderlaß bei den serumspendenden Kaninchen stets nach 4—6 Tagen ausgeführt und hierbei nicht nur hochpräzipitierende, sondern reichlich anaphylaktische Immunkörper enthaltende Sera erhalten, von denen 0,1 ccm völlig ausreichte, um ein Meerschweinchen hochgradig passiv zu sensibilisieren.

Das Auftreten der Präzipitine koinzidiert also sowohl bei ein-, als bei mehrmaliger Injektion völlig mit dem des anaphylaktischen Immunkörpers.

Ebenso verhält sich das Verschwinden. Die Immunkaninchen 423, 493, 443, 477 und 489 waren zu unseren letzten Untersuchungen verwendet worden. Sie hatten sämtlich präzipitierende Sera geliefert, die auch passiv gut anaphylaktisierten (siehe die Versuche in dieser Zeitschrift, Bd. 3, Heft 2). Während einer achtwöchentlichen Unterbrechung unserer Arbeiten blieben die Tiere in Ruhe; am 9. August wurde ein Aderlaß gemacht und die Sera auf Präzipitin und anaphylaktischen Immunkörper geprüft. Das Kaninchen 423 war früher mit Menschenserum, 443 und 494 mit Schweineserum, 477 mit Ziegenserum, 489 mit Rinderserum behandelt worden; mit diesen Antigenen wurden natürlich die Prüfungen vorgenommen.

#### A. Präzipitingehalt.

Verdünnung	Serum 423	Serum 443	Serum 494	Serum 477	Serum 489
10	⊕	⊕	⊕	leichte Trüb.	Spur
20	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
80	⊕	⊕	⊕	” ⊕ ”	⊕
160	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
640	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕



## B. Gehalt an anaphylaktischem Immunkörper.

M. 700	am 12. VIII. 1,0	Ser. 423 ip.,	am 13. VIII. 0,2	Menschens. iv.	θ
" 701	" 12. VIII. 1,0	" 443 "	" 13. VIII. 0,1	Schweines. "	θ
" 702	" 12. VIII. 1,0	" 443 "	" 13. VIII. 0,05	" "	θ
" 703	" 12. VIII. 1,0	" 477 "	" 13. VIII. 0,5	Ziegens. "	θ
" 704	" 12. VIII. 1,0	" 489 "	" 13. VIII. 0,25	Rinders. "	leichteste Sympt.

8 Wochen nach der letzten Injektion waren also Präzipitin und anaphylaktischer Immunkörper verschwunden. Nur Serum 489 enthielt Spuren von beiden.

Weiters wurden Bedenken geäußert gegen die Annahme einer cytophilen Gruppe des Präzipitins resp. des anaphylaktischen Immunkörpers. So meinte Detre, daß nach klinischen Erfahrungen, die er am Krankenbette mit wiederholten Seruminjektionen gemacht, eher die Verankerung des Antigens anzunehmen sei. Wäre diese Anschauung richtig, dann müßte die Umkehrung des passiv anaphylaktischen Experimentes gelingen, man müßte Shockwirkung erhalten, wenn man zuerst das Antigen und dann anaphylaktischen Immunkörper injiziert. Das ist aber nicht der Fall; es bleibt vielmehr jeder Effekt aus. Da gegenteilige Behauptungen (v. Pirquet, Weil-Hallé und Lémaire) in der Literatur vorliegen, haben wir diese Frage genau und wiederholt nachgeprüft, unter Variierung aller Faktoren; doch blieb das Resultat ausnahmslos negativ. Ein paar solcher Versuche mögen hier Platz finden.

## I.

3 Meerschweinchen wurden längere Zeit mit erhitztem Aalserum immunisiert, 18 Tage nach der letzten Injektion entblutet, die Sera gemischt. Das Gemisch präzipitierte stark erhitztes Aalserum (60° C) und machte gegen dasselbe passiv anaphylaktisch:

M. 10	erhält 3,0	Serumgemisch ip.,	nach 24 <sup>h</sup> 0,1	erh. Aals. iv.	† 5'
" 11	" 1,0	" "	" 24 <sup>h</sup> 0,2	" "	† 5'
" 12	" 0,5	" "	" 24 <sup>h</sup> 0,2	" "	schwere Sympt.
" 13	" 1,0	" "	" 24 <sup>h</sup> 0,2	" "	" "
" 14	" 1,0	" "	" 24 <sup>h</sup> 0,1	" "	" "

Injizierte man zuerst erhitztes Aalserum und dann das Serumgemisch, so blieb die Reaktion aus:

Meerschweinchen 15	erhält 1,0	erh. Aalserum,	nach 24 <sup>h</sup> 1,0	Serumgemisch	θ
" 16	" 0,2	" "	" 24 <sup>h</sup> 1,0	" "	θ

## II.

Kaninchen 477 lieferte Antiziegenserum (Präzipitationstiter > 1280).  
Nun bekamen:

Meerschw.	50	1,0	Serum	477 ip.,	nach 24 <sup>b</sup>	0,2	Ziegenserum iv.	† 5'
"	51	1,0	"	477 "	" 24 <sup>b</sup>	0,1	" "	† 5'
"	52	1,0	"	477 "	" 24 <sup>b</sup>	0,05	" "	† 5'

Dagegen:

Meerschw.	53	0,2	Ziegenserum	nach 24 <sup>b</sup>	1,0	Serum	477 iv.	⊖
"	54	0,1	"	" 24 <sup>b</sup>	0,1	"	477 "	⊖
"	55	0,05	"	" 24 <sup>b</sup>	1,0	"	477 "	⊖

Und:

Meerschw.	56	1,0	Ziegenserum	nach 24 <sup>b</sup>	0,2	Serum	477 iv.	⊖
"	57	1,0	"	" 24 <sup>b</sup>	0,1	"	477 "	⊖
"	58	1,0	"	" 24 <sup>b</sup>	0,05	"	477 "	⊖

Das Antigen kann also nicht in dem Sinne gebunden werden, daß es mit später zugeführtem Immunkörper reagiert.

Wird aber der anaphylaktische Immunkörper verankert und ist er wirklich identisch mit dem Präzipitin, so ist zu verlangen, daß man nachweist, daß das Präzipitin, welches man einem empfindlichen Tier, z. B. einem normalen Meerschweinchen intravenös injiziert, aus dem Kreislauf tatsächlich verschwindet (Neufeld).

## 1. Versuch.

Einem mittelgroßen Meerschweinchen No. 300 wurde in die linke Jugularis 2,0 ccm eines Antirinderserums injiziert. Dasselbe stammte von Kan. 489, präzipitierte Rinderserum noch in einer Verdünnung von 1:3200, und enthielt dementsprechend reichlich anaphylaktischen Immunkörper, wie folgender Vorversuch ergab:

Meerschw.	1	erhielt 1,0 Ser.	489 ip.,	nach 24 <sup>b</sup>	0,3	Rinders. iv.	† 5'
"	1	" 0,3 "	489 "	" 24 <sup>b</sup>	0,3	" "	† 5'
"	3	" 0,1 "	489 "	" 24 <sup>b</sup>	0,3	" "	schwere Sympt.

5 Minuten, nachdem Meerschw. 300 2,0 ccm dieses Serums in die linke Jugularis erhalten hatte, wurde ein kleiner Aderlaß aus der rechten Carotis gemacht, und das gewonnene Serum auf den Gehalt an Rinderpräzipitin untersucht:

1,0 Rinders.	(1:40) + 0,5	Serum vom Meerschw. 300	+++
1,0 "	(1:80) + 0,5	" "	+++

Nach 24<sup>b</sup> wurde das Tier 300 entblutet und abermals der Präzipitinhalt seines Serums festgestellt:

1,0 Rinders.	(1:10) + 0,5	Serum vom Meerschw. 300	⊖
1,0 "	(1:40) + 0,5	" "	⊖
1,0 "	(1:80) + 0,5	" "	⊖

## 2. Versuch.

Ganz analog dem früheren, nur wurde das Tier mit 3,0 Serum 489 injiziert und nach 5<sup>h</sup> entblutet; hier waren die Präzipitine noch scheinbar intakt.

Intravenös injizierte Präzipitine verschwinden also tatsächlich aus dem Kreislauf, allerdings nicht so rasch als man nach der Verankerung des anaphylaktischen Immunkörpers, die ja schon in wenigen Stunden erfolgt, annehmen sollte. Ein Meerschweinchen, dem man intravenös passiv anaphylaktisierendes Serum injiziert, reagiert auf Antigen schon nach 4 Stunden mit Tod (Doerr und Russ); in den vorstehenden Versuchen hatten die Präzipitine aber nicht nach 5, sondern erst nach 24 Stunden merklich abgenommen.

Man darf aber eines nicht vergessen; bei diesen Versuchen muß man hohe Dosen präzipitierenden Serums injizieren (im ersten Versuch 2,0 ccm, im zweiten sogar 3,0), da sonst infolge der Verdünnung desselben durch das Blut des Versuchstieres der Nachweis des Präzipitins unmöglich wird. Solche Dosen enthalten aber viel mehr anaphylaktischen Immunkörper, als zur passiven Uebertragung einer intensiven Hypersensibilität nötig ist; vom Serum 489 genügt hierzu ja schon 0,1—0,3 ccm, also etwa ein Zwanzigstel. Es ist also sehr gut denkbar, daß nach 5 Stunden von dem injizierten Ueberschuß nur eine bestimmte Menge des Immunkörpers gebunden wird, die das Tier zwar passiv überempfindlich macht, sich aber noch nicht als Reduktion des einverleibten Präzipitins zu erkennen gibt.

## III.

In jüngster Zeit hat Friedberger darauf hingewiesen, daß sich das Präzipitationsphänomen (*in vitro*) aus zwei Vorgängen aufbaut, und zwar der sichtbaren Niederschlagsbildung und der Verankerung etwa vorhandenen Komplementes, und konnte zeigen, daß auch bei der anaphylaktischen Reaktion der Meerschweinchen eine ganz regelmäßige und beträchtliche Verarmung des Blutes an Komplement eintritt. Diese zwar schon von anderer Seite beschriebene (Nicolle und Abt, Sleeswijk, Michaelis), aber zuerst von Friedberger am Meerschweinchen einwandsfrei und

durch quantitative Komplementbestimmung nachgewiesene Tatsache konnten nun auch wir bei anaphylaktischen Hunden beobachten.

#### Versuch.

Hund I bekam am 6., 8., 10., 12. Juli je 1,0 ccm Rinderserum subkutan, am 15. Juli 2,0 ccm intravenös, am 20. und 23. Juli je 2,0 ccm intraperitoneal, endlich am 28. August abermals 2,0 ccm intraperitoneal. Am 4. September wurde ein Probeaderlaß gemacht und der Komplementgehalt des Serums durch Aktivierung von hämolytischem Ambozeptor bestimmt. (0,01 Ambozeptor =  $2\frac{1}{2}$ -fach lösende Dosis löst mit 0,05 Meer-schweinchenkomplement 0,1 50-proz. Hammelerythrocyten-Aufschwemmung in 15'. — Es wurde also je 0,01 dieses Ambozeptors mit fallenden Mengen Hundeserum, 0,1 Hammelerythrocyten (50-proz.) und NaCl ad 2,0 ccm aufgefüllt und nach zweistündigem Aufenthalt das Resultat abgelesen. — +++ = komplette Hämolyse, ++ = fast komplett, + = Spur Hämolyse,  $\emptyset$  = keine Hämolyse.

Hundekomplement von dem 1. Aderlaß (vor der Reinjektion):

0,4	+++
0,2	+++
0,1	+++
0,05	+++

Dann wurde intravenös, 15 Min. nach diesem 1. Aderlaß, 1,0 Rinderserum injiziert, und 5 Min. sowie 30 Min. nach der Injektion ein 2. und 3. Probeaderlaß gemacht.

Hundekomplement nach der Reinjektion von Rinderserum:

5' später (2. Aderlaß)	30' später (3. Aderlaß)
0,4 $\emptyset$	0,4 $\emptyset$
0,2 $\emptyset$	0,2 $\emptyset$
0,1 $\emptyset$	0,1 $\emptyset$
0,05 $\emptyset$	0,05 $\emptyset$

Die Tatsache des Komplementschwundes bei Reinjektion anaphylaktischer Tiere steht also fest.

Friedberger und Hartoch glauben nun nicht, daß die Komplementverarmung des strömenden Blutes an sich die anaphylaktischen Symptome bewirke, da diese durch reichliche Komplementzufuhr nicht verhindert werden können; dagegen sehen sie in der Verankerung des Komplementes durch die Verbindung von Präzipitin und präzipitabler Substanz einen Vorgang, der mit den anaphylaktischen Erscheinungen in kausalem Konnex steht, in dem Sinne, daß das Präzipitat nur das Binde-

glied zwischen der empfindlichen Zelle und dem Komplement als eigentlichem Träger der cytotoxischen Wirkung darstellt. Er stützt sich hierbei auf Versuche, nach welchen Hypertonie des Blutes, erzeugt durch Injektion konzentrierter Kochsalzlösung, Anaphylaxie und Komplementverankerung verhindert.

Wir schließen uns dieser Auffassung als einer natürlichen Konsequenz der Präzipitationstheorie umsomehr an, als ja auch bei anderen cytotoxischen Prozessen (Hämolyse) das Komplement den toxischen Faktor repräsentiert und Versuche von Doerr und Moldovan, die demnächst veröffentlicht werden sollen, für die Friedbergersche Annahme sprechen.

Nur möchten wir darauf aufmerksam machen, daß bei der Verhütung der Anaphylaxie durch Salzinjektion (Hypertonie des Blutes) vielleicht noch ein anderes Moment als die behinderte Komplementbindung allein interveniert.

In hypertonen Kochsalzlösungen bleibt bekanntlich auch, besonders bei starker Verdünnung des Antigens, die Vereinigung von Präzipitin und präzipitabler Substanz aus; namentlich kann man sich sehr leicht überzeugen, daß in hypertonen Lösungen die Schnelligkeit des Präzipitationsphänomens ganz erheblich beeinträchtigt wird.

#### 1. Versuch.

Von Rinderserum werden in üblicher Weise Verdünnungen, und zwar mit physiologischer, 2-, 4- und 8-proz. NaCl-Lösung hergestellt und 0,1 ccm Antirinderserum vom Kaninchen No. 428 zugefügt.

	Physiol. NaCl	2-proz. NaCl
200	sofort dichte Trübung, nach 2 <sup>h</sup> bei 37° + + +	sofort Trübung, nach 2 <sup>h</sup> bei 37° + + +
400	ebenso	ebenso
800	ebenso	sofort nur Spur Trübung, nach 2 <sup>h</sup> bei 37° + +
1600	ebenso	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° + +
3200	ebenso	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° +
	4-proz. NaCl	8-proz. NaCl
200	sofort Spur Trübung, nach 2 <sup>h</sup> bei 37° + +	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° + +
400	ebenso	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° + +
800	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° + +	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° +
1600	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° + +	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° Trübung
3200	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° Trübung	nach 2 <sup>h</sup> bei 37° θ

## 2. Versuch.

Je 4 ccm Verdünnungen von Hammelserum 1:1000, hergestellt mit physiologischer, 2-, 4-, 8-proz. NaCl-Lösung, werden mit 0,4 ccm Antihammelserum vom Kaninchen No. 439 versetzt und der Ablauf der Präzipitation beobachtet. Dabei zeigte sich, daß die Reaktion, die bei Röhrchen I (physiolog. Kochsalzlösung) sofort auftrat, bei Röhrchen II (2-proz.), III (4-proz.) und IV (8-proz.) immer mehr verzögert und wesentlich schwächer auftrat.

Bei der Reinjektion des anaphylaktischen Tieres erfährt nun tatsächlich das Antigen eine ganz enorme Verdünnung. Wenn man z. B. 0,1 oder 0,2 ccm Rinderserum einem gegen Rinderserum empfindlichen Meerschweinchen intravenös einverleibt, so wird, wenn man die Blutmengen des Meerschweinchen auf 40 ccm veranschlagt, das reinjizierte Antigen 200- bis 400-fach verdünnt. Nun kommt noch dazu, daß für den Eintritt der Shockwirkung offenbar eine ganz plötzliche Vereinigung von Antigen und sessilem Präzipitin erforderlich ist. Erfährt dies durch die Hypertonie des Mediums eine Verzögerung, so daß Antigen und Immunkörper nur ganz allmählich in Verbindung treten, so bleiben foudroyante Symptome natürlich aus.

Vielleicht ist diese Verzögerung der Präzipitation durch Hypertonie des Mediums im Organismus des Meerschweinchen eine noch viel intensivere als in vitro. Das hypertonsche Medium im Meerschweinchen ist nämlich nicht eine einfache Salzlösung, wie in den obigen Versuchen, sondern hypertones Serum.

Solches salzreiches Serum hemmt tatsächlich das Präzipitationsvermögen weitaus stärker als die gleich konzentrierte hypertonsche Kochsalzlösung, wie der nachfolgende Versuch zeigt.

## 3. Versuch.

- 25 ccm physiologischer NaCl-Lösung + 1,25 ccm Antihammelserum + 1 ccm physiol. NaCl-Lösung + 0,2 ccm Hammelserum: **nach 2'** dichte Trübung, nach 1<sup>h</sup> bei 37° +++
- 25 ccm physiol. NaCl-Lösung + 1,25 ccm Antihammelserum + 1 ccm konzentrierter NaCl-Lösung + 0,2 ccm Hammelserum: **nach 20'** beginnende Trübung, nach 1<sup>h</sup> bei 37° +++
- 25 ccm Pferdeserum + 1,25 ccm Antihammelserum + 1 ccm physiol. NaCl-Lösung + 0,2 ccm Hammelserum: **nach 10'** beginnende Trübung, nach 1<sup>h</sup> bei 37° +

25 ccm Pferdeserum + 1,25 ccm Antihammelserum + 1 ccm konzentrierter NaCl-Lösung + 0,2 ccm Hammelserum: **erst nach 1<sup>h</sup> bei 37°** leichte Trübung.

### Zusammenfassung.

1) Die Fähigkeit, zu sensibilisieren, toxisch zu wirken und Antianaphylaxie zu erzeugen, sind Funktionen desselben Antigens, des spezifischen Eiweißes.

2) Erhitzt man Lösungen eines solchen Antigens (durch Zusatz von destilliertem Wasser unkoagulierbar gemachtes Serum), so bleibt ein gewisser Anteil des Antigens erhalten, dessen Menge der Dauer und dem Grade der Erhitzung umgekehrt proportional ist. Auf 90—100° erwärmte Eiweißlösungen enthalten nur mehr Spuren nicht denaturierten Antigens.

3) Daß das Erhitzen tatsächlich nur eine rein quantitative Abnahme des spezifischen Eiweißes, nicht aber eine Zerstörung einer bestimmten Eigenschaft desselben bewirkt, wie Besredka, Kraus und Volk meinen, erhellt daraus, daß man durch einfaches Verdünnen von Serum mit isotoner NaCl-Lösung Antigenlösungen erhält, die sich im anaphylaktischen Experiment genau wie erhitzte Sera verhalten.

4) Der Gehalt erhitzter Sera an präzipitierbarer Substanz steht in direkter Proportion zu ihrem Gehalt an anaphylaktischem Antigen.

5) Die zeitliche Entwicklung der aktiven Anaphylaxie und die Zeit des Auftretens des anaphylaktischen Immunkörpers im Blute stimmt vollkommen mit den Gesetzen, die wir bei anderen Formen aktiver Immunität, und bei dem Erscheinen anderer Antikörper im Blute kennen. Insbesondere kommt und verschwindet der anaphylaktische Immunkörper nach derselben Zeitfolge wie die Präzipitine.

6) Das anaphylaktische Experiment läßt sich nicht umkehren, d. h. vorinjiziertes Antigen wird nicht in dem Sinne an die giftempfindlichen Zellen fixiert, daß reinjizierter Immunkörper toxisch wirkt.

7) Injiziertes Präzipitin verschwindet aus der Zirkulation in 24 Stunden; es wird also so wie der anaphylaktische Immunkörper von den Geweben des Meerschweinchens gebunden, womit ein weiterer Beweis für die Identität beider geliefert ist.

8) Die von Friedberger und Hartoch am Meerschweinchen beobachtete Komplementverarmung infolge der anaphylaktischen Reaktion kann auch an Hunden leicht festgestellt werden.

9) Die von Friedberger und Hartoch festgestellte Verhinderung der Anaphylaxie durch Injektion konzentrierter Salzlösung (Hypertonie des Blutes) muß nicht ausschließlich auf der Unmöglichkeit der Komplementverankerung beruhen; sie kann auch zum Teil erklärt werden durch die Tatsache, daß Präzipitin und präzipitable Substanz in hypertonen Salzlösungen, besonders in hypertonischem Serum, träge und unvollkommen reagieren.

#### Literatur.

- 1) Friedberger, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 2, Heft 2.
- 2) Friedberger, Berl. klin. Wochenschr., 1909, No. 36.
- 3) Besredka, Annal. Past., 1908.
- 4) Kraus und Volk, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 1, Heft 5.
- 5) — — ebenda, Bd. 3, Heft 3.
- 6) Friedemann, ebenda, Bd. 2, Heft 5.
- 7) Sleeswijk, ebenda, Bd. 2, Heft 2.
- 8) Doerr und Russ, ebenda, Bd. 2, Heft 1.
- 9) — — ebenda, Bd. 3, Heft 2.



*Nachdruck verboten.***Ueber die Kriterien des anaphylaktischen Zustandes.**

**Erwiderung auf den Aufsatz des Herrn Prof.  
R. Kraus. (Diese Zeitschr. Bd. 3, Heft 2, 1909.)**

Von Privatdozent Dr. U. Friedemann.

(Eingegangen bei der Redaktion am 20. Oktober 1909.)

In Bd. 2, Heft 5 dieser Zeitschrift habe ich Versuche über die Anaphylaxie gegen rote Blutkörperchen und über die Serumanaphylaxie beim Kaninchen mitgeteilt. Der Grund, weshalb ich beim Studium der Anaphylaxie von dem in letzter Zeit so viel bearbeiteten Theobald Smithschen Phänomen abgegangen bin, war im wesentlichen der, durch Herbeischaffung eines größeren Tatsachenmaterials festzustellen, inwieweit die beim Theobald Smithschen Phänomen beobachteten Erscheinungen für die Anaphylaxie im allgemeinen charakteristisch sind, inwieweit sie nur durch die Besonderheit der Versuchsanordnung und die Wahl der Tierart bedingt sind. Ferner hoffte ich durch die Analyse eines dem Experiment so gut zugänglichen Vorganges, wie es die Blutkörperchenanaphylaxie ist, über einige die Anaphylaxie im allgemeinen betreffende und mit den bisherigen Versuchsanordnungen nicht lösbare Fragen Aufschluß zu erhalten. Ganz besonders zeigte sich die Blutkörperchenanaphylaxie geeignet, auf die Rolle der Komplemente bei der Anaphylaxie Licht zu werfen. Von verschiedenen Seiten war bereits der Gedanke ausgesprochen worden, daß bei dem anaphylaktischen Shock der Vorgang der Komplementbindung eine Rolle spielen könne, meist aber in der Form, daß der Schwund der Komplemente als lebenswichtiger Stoffe an sich den Ausbruch der anaphylaktischen Symptome nach sich ziehe. Es ließ sich nun auf experimentellem Wege einwandfrei der Beweis erbringen, daß bei der Blutkörperchenanaphylaxie das Komplement notwendig ist, um — auch ohne Hämolyse — aus den Blutkörperchen das anaphylaktische Gift in Freiheit zu setzen. Diese Vorstellung habe ich dann auf die Serumanaphylaxie übertragen. Es folgt daraus, daß, entgegen der üblichen Auf-

fassung, nicht der Schwund des Komplementes, sondern gerade dessen Gegenwart die notwendige Vorbedingung für das Zustandekommen der Anaphylaxie ist, wofür auch die Versuche von Uhlenhuth und Händel, Friedberger und Hartoch an Vögeln sprechen. Ich habe dann ferner darauf hingewiesen, daß die Antianaphylaxie möglicherweise durch den nach größeren Eiweißinjektionen erfolgenden Komplementschwund zu erklären sei. Die Auffassung von der Bedeutung der Komplemente ist inzwischen vollständig durch die schönen Untersuchungen bestätigt worden, die Friedberger und Hartoch bei der Eiweißanaphylaxie angesellt haben. Diese Autoren gingen von der Tatsache aus, daß bei der Hämolyse die Bindung des Komplementes durch Erhöhung der Salzkonzentration verhindert werden kann, und injizierten nun überempfindlichen Meerschweinchen vor der Reinjektion konzentrierte Salzlösungen. Es gelang ihnen so in der Tat, unter geeigneten Bedingungen die mit Salz behandelten Tiere im Gegensatz zu den Kontrollen am Leben zu erhalten.

Die Beweiskraft meiner Versuche hat nun R. Kraus in Frage gezogen, indem er kategorisch behauptet, daß die von mir beobachtete Erscheinung bei der Reinjektion von Blutkörperchen mit der Anaphylaxie nichts zu tun habe, sondern einfach auf der Giftigkeit der hämolytischen Sera beruhe. Es unterliegt für mich gar keinem Zweifel, und ich glaube, dies durch quantitative Versuche exakt bewiesen zu haben —, daß die Hämolyse das Vergiftungsbild bei der Reinjektion hervorrufen; aber es ist mir ganz unverständlich, warum diese Beobachtungen nichts mit der Anaphylaxie zu tun haben sollen. Daß andere Autoren <sup>1)</sup> schon zu einer Zeit über die Giftigkeit hämolytischer Sera Versuche angestellt haben, als man die Anaphylaxie noch nicht kannte oder sie jedenfalls mit diesen Beobachtungen nicht in Zusammenhang brachte, scheint mir kein ausreichender Grund zu sein. Auch den Einwand, daß der ja nur den Erythrocyten zukommende Vorgang der Hämolyse an sich die Vergiftung hervorrufe, oder daß gar die physikalische Veränderung der Blutkörperchen ausschlag-

1) In meiner Arbeit war es mir entgangen, daß auch Kraus und Sternberg derartige Versuche ausgeführt haben. Ich trage dies hiermit nach.

gebend sei, habe ich experimentell widerlegt, indem ich noch vor der Hämolyse das Gift aus den Blutkörperchen gewinnen konnte. Die Verhältnisse liegen hier gar nicht anders wie bei irgendeiner anderen Zellart, und es ist höchst sonderbar, daß derselbe Autor, welcher die Blutkörperchenanaphylaxie nicht anerkennt, eine Arbeit mit Doerr über die Bakterienanaphylaxie veröffentlicht hat. Der prinzipielle Unterschied, den Kraus zwischen Blutkörperchen und Bakterien konstruiert, ist jedenfalls schwer verständlich.

Weiterhin stellt nun Kraus in recht willkürlicher Weise eine Reihe von Kriterien auf, die seiner Ansicht nach für die Anaphylaxie charakteristisch sind und bei der Blutkörperchenanaphylaxie fehlen. Zunächst wird mir vorgeworfen, daß ich lediglich auf das klinische Bild der Vergiftung hin von Anaphylaxie gesprochen hätte. Ich verstehe nicht, wie Kraus aus der Lektüre meiner Arbeit zu diesem Schluß gelangt ist. Mir ist aus eigenen Beobachtungen längst bekannt, daß es unzählige Substanzen gibt, welche ähnliche Erscheinungen erzeugen. Um eine anaphylaktische Erscheinung handelt es sich vielmehr, weil hier ein zunächst ungiftiges Antigen bei der Reinjektion schwere Krankheitserscheinungen hervorruft, ohne daß bei der Länge des Injektionsintervalles an eine Summierung der Giftwirkung gedacht werden könnte.

Diese Definition, die meiner Ansicht nach erschöpfend ist, genügt Kraus aber nicht. Vielmehr gehören nach der Auffassung dieses Autors noch die folgenden Tatsachen notwendig zum Wesen der Anaphylaxie:

1) Die passive Anaphylaxie kommt nicht zustande bei direkter Mischung des Sensibilinogens mit dem anaphylaktischen Reaktionskörper;

2) die Antianaphylaxie.

Beide Erscheinungen sind in ausgesprochener Form bisher nur bei der Anaphylaxie des Meerschweinchens beobachtet worden, und ich will einmal annehmen, sie wären hier über allen Zweifel erhoben. Auch dann ist es aber sehr bedenklich, diese Tatsachen ohne weiteres zu verallgemeinern oder gar das Theobald Smithsche Phänomen als das einzig legitime Beispiel für die Anaphylaxie gelten zu lassen, wozu neuer-

dings in der Literatur vielfach Neigung vorhanden ist. Das geht schon aus historischen Gründen nicht an, weil ja Richet und Arthus diesen Namen für ganz andere Vorgänge geprägt haben.

Ich habe nun aber auch direkt experimentell gezeigt, daß diese Verallgemeinerung unzulässig ist. Ich sehe dabei ganz von der Blutkörperchenanaphylaxie ab und berufe mich lediglich auf meine Versuche über die Serumanaphylaxie des Kaninchens, die wohl auch Kraus in das Gebiet der Anaphylaxie einreihen wird. Es zeigte sich, daß hier die passive Uebertragung am besten gelingt, wenn das anaphylaktische Serum mit dem Antigen gemischt injiziert wird.

Daß beim Meerschweinchen das anaphylaktische Serum mehrere Stunden vor dem Pferdeserum injiziert werden muß, habe ich ja ebenso wie Otto selbst beschrieben und dafür die wohl allgemein akzeptierte Deutung gegeben, daß der anaphylaktische Reaktionskörper zunächst vom Zentralnervensystem gebunden werden muß. Ich hoffe aber demnächst zeigen zu können, daß auch beim Meerschweinchen bei geeigneter Versuchsanordnung die passive Anaphylaxie nach Mischung beider Komponenten zu erzielen ist. Dieses Kriterium ist also jedenfalls zur Charakterisierung der Anaphylaxie ungeeignet.

Was nun die Antianaphylaxie betrifft, so hat man hier meiner Ansicht nach zwei Tatsachen auseinander zu halten. Die eine ist von Kraus bereits hervorgehoben worden und besteht darin, daß nach Ueberstehen des anaphylaktischen Shocks das Tier zunächst unempfindlich gegen eine neue Injektion ist. Ich will nicht bestreiten, obwohl ich daraufhin keine besonderen Versuche angestellt habe, daß nicht auch bei der Blutkörperchenanaphylaxie wenige Stunden nach Ueberstehen der Shocks eine Unempfindlichkeit gegen eine neuerliche Injektion besteht. Ich möchte dies sogar auf Grund der Versuche von Gottlieb und Lefmann für wahrscheinlich halten. Diese Erscheinung ist aber gar nicht charakteristisch für die Anaphylaxie, sondern findet sich bei einer großen Reihe von Vergiftungen wieder, — ich verweise nur auf die Blutgerinnung erregenden Substanzen, auf die Peptonvergiftung und auf die von Weichardt als Kenotoxine be-

zeichneten Substanzen. Es ist meiner Ansicht nach durchaus falsch, hier von Antianaphylaxie zu sprechen.

Eigentümlich hingegen ist es, daß beim Meerschweinchen dieser Zustand der Unempfindlichkeit wochenlang andauert. Auch diese Erscheinung ist aber bei der Serumanaphylaxie des Kaninchens durchaus nicht in dieser ausgesprochenen Weise vorhanden, und hängt wahrscheinlich damit zusammen, daß sich beim Meerschweinchen ein großer Teil der Prozesse im Zentralnervensystem abspielt. Sie ist also für die Anaphylaxie nicht charakteristisch und es liegt daher kein Grund vor, die Blutkörperchenanaphylaxie wegen Fehlens der Anti-anaphylaxie von der Anaphylaxie auszuschließen.

Ob es heute schon zweckmäßig ist, die Erscheinungen der Anaphylaxie systematisch von den übrigen Formen der Ueberempfindlichkeit abzutrennen, möchte ich dahingestellt sein lassen. Jedenfalls darf dies aber nicht in einer so äußerlichen und historisch ungerechtfertigten Weise geschehen, wie dies Kraus getan hat. Wenn den anaphylaktischen Erscheinungen etwas Besonderes zukommt, so ist dies vielleicht die Tatsache, daß es sich um Vorgänge handelt, bei denen es zur Bildung von Ambozeptoren kommt. Soviel ist jedenfalls sicher, daß die Entstehung von Ambozeptoren stets mit Ueberempfindlichkeitserscheinungen einhergehen kann. Es wäre sehr interessant, zu untersuchen, ob auch bei den bisher nicht näher analysierten Anaphylaxieformen (Actiniengift, Tuberkulin usw.) anaphylaktische Reaktionskörper vom Ambozeptortypus nachzuweisen sind. Diese ganze Gruppe von Erscheinungen würde dann scharf der Toxinüberempfindlichkeit gegenüberstehen, bei der Serumveränderungen bisher nicht nachgewiesen wurden. Eine weitere Differenz zeigt sich darin, daß bei der Toxinüberempfindlichkeit die typischen Symptome der Toxinvergiftung auftreten, während bei der Ambozeptorenanaphylaxie Symptome der Vergiftung beobachtet werden, die dem Antigen an sich nicht zukommen, bei allen Formen der Ambozeptorenanaphylaxie aber sehr gleichartige Züge bieten. Man könnte daher bei den Toxinen von isotoxischer, bei den Ambozeptoren von heterotoxischer Ueberempfindlichkeit sprechen.

*Nachdruck verboten.*

[Aus der bakteriol. Abteilung des Pathologischen Instituts Basel.]

### **Experimentelle Studien über Phagocytose.**

Als Beitrag zur Klärung moderner Probleme der  
Immunitätsforschung.

(Problem der Opsonine, Aggressine etc.)

Von **Ernst Sauerbeck** (Basel).

Mit 10 Figuren im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 23. August 1909.)

Die kritische Verarbeitung der neueren Immunitätstheorien, wie sie von Wright, Neufeld-Rimpau und Bail aufgestellt wurden, hat eine Fülle neuer Probleme ergeben<sup>1)</sup>.

Einige von ihnen der Lösung entgegenzuführen, war der Zweck der Versuche, über die hier berichtet werden soll<sup>2)</sup>.

Es sind in der Hauptsache 3 Probleme:

- 1) das des Verhältnisses von Toxinen und Antitoxinen zu den hypothetischen phagocytosefördernden Substanzen,
- 2) das des Verhältnisses der Bakteriolyse,
- 3) das des Verhältnisses der Aggressine zu denselben Stoffen.

Je ein Hauptteil dieser Arbeit ist einem der 3 Probleme gewidmet.

---

1) Siehe Sauerbeck: Ueber die Aggressine, *Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.*, Bd. 56, 1906. — Derselbe: Tatsachen und Theorien in der neuen Immunitätsforschung, Wiesbaden (Bergmann) und Lubarsch-Ostertags Ergebnisse, Bd. 11, 1907, p. 691. — Derselbe: Die Krisis in der Immunitätsforschung, Leipzig (Klinkhardt) 1909, und *Folia haem.*, 1909, p. 1. — Unter Hinweis auf diese meine früheren Arbeiten darf wohl auch Berücksichtigung der Literatur im Text verzichtet werden.

2) Die Versuche sind im Sommer 1907 ausgeführt; ihre Veröffentlichung hat sich leider infolge eines Zufalls sehr verspätet. Der weit zurückliegende Zeitpunkt ist bei Würdigung der Fragestellung in Rechnung zu ziehen. — Eine ausführlichere Darstellung und Begründung der Problemstellung, wie sie ursprünglich vorgesehen, erübrigt sich wohl nach dem Erscheinen meiner letzten Publikation.

Den 3 Hauptteilen geht die Angabe von Methode und Technik sowie eine Voruntersuchung über deren Zuverlässigkeit voran.

Es folgt ihnen als Nachtrag die Beschreibung eines höchst merkwürdigen Versuches, der, wenn er sich bestätigen sollte, auf die Deutung der Ergebnisse des 1. und 2. Hauptteils entscheidend zurückwirken müßte.

### **Vorbemerkungen über Methode und Technik.**

#### **1. Kritische Betrachtungen.**

##### **Kritik der Methode.**

Die übliche Methode der quantitativen Bestimmung der Phagocytose<sup>1)</sup> besteht darin, daß man die Zahl der aufgenommenen Bakterien in einer größeren Zahl von Leukocyten bestimmt und dann die Durchschnittszahl berechnet (absoluten Index nach meiner Nomenklatur, „phagocytic count“ nach der Wrightschen<sup>2)</sup>).

Schon die wesentlichen Glieder dieser Methode der quantitativen Bestimmung der Phagocytose, **Zählung und Berechnung** nämlich, geben zu einer kritischen Bemerkung Veranlassung.

Wright, dem wir die erste größere Versuchsreihe auf unserem Gebiete verdanken, pflegte, um den Durchschnittswert der Phagocytose zu erhalten, etwa 20 Leukocyten auszuzählen. Es hat nicht an Stimmen gefehlt, die diese Zahl für zu gering hielten, um die individuellen Unterschiede der Phagocyten auszumerzen. Doch ist darauf wenig geachtet worden.

Nach meinen eigenen Erfahrungen ist nun das Postulat, daß mehr, und zwar erheblich mehr als 20 Phagocyten zu zählen sind, durchaus berechtigt.

Die Intensität der Phagocytose ist nämlich bei den verschiedenen Zellen eine ganz außerordentlich verschiedene. Es ist im allgemeinen keine Rede davon, daß die einzelnen Werte

1) Es handelt sich hier natürlich nur um den Versuch in vitro; daß wir diesen trotz manchen berechtigten Bedenken, wie sie besonders Metschnikoff hervorhebt, nicht entbehren können, ja, daß wir in ihm unser Hauptforschungsmittel auf unserem Gebiete anzuerkennen haben, leuchtet wohl ein.

2) Ich halte meine Nomenklatur gegenüber gewissen Beanstandungen aufrecht.

um den Durchschnittswert nur in unbeträchtlichen Ausschlägen schwanken; der Betrag dieser Ausschläge ist vielmehr, auch wenn man seinen Durchschnittswert, den sogenannten mittleren Fehler berechnet, ein sehr großer.

Fast durchweg findet man zahlreiche Zellen, die überhaupt ohne Bakterien sind; fast ausnahmslos auch solche, die von Bakterien strotzen.

Was aber die Unsicherheit der Berechnung besonders steigert, ist der Umstand, daß die Verteilung besonders der (im allgemeinen freilich spärlichen) starkgefüllten Zellen eine sehr ungleiche ist, daß man oft viele Gesichtsfelder vergebens nach ihnen durchsucht, um plötzlich auf einen ganzen Haufen zu stoßen.

#### Beispiel I.

Phagocytose von Staphylokokken in Kochsalzlösung: gezählt 120 Leukocyten. Diese enthielten:

$87 \times 0$ Bakterien	$3 \times 4$ Bakterien	$3 \times 12$ Bakterien
$5 \times 1$ "	$1 \times 5$ "	$1 \times 16$ "
$9 \times 2$ "	$1 \times 7$ "	$1 \times 25$ "
$5 \times 3$ "	$4 \times 8$ "	

Der Durchschnitt ist  $1\frac{1}{2} = < 1\frac{1}{2}$ .

Teilt man die 120 Leukocyten in 6 Gruppen von je 20 (nach Maßgabe der Reihenfolge, in der sie zur Beobachtung kamen) und rechnet für jede den Durchschnitt besonders, so bekommt man statt  $1\frac{1}{2}$  die 6 Zahlen:

$$1\frac{1}{2} = 1\frac{1}{2}, \quad 1\frac{1}{2} = < 4, \quad 1\frac{1}{2} = 3, \quad 1\frac{1}{2} = 1\frac{1}{2}, \quad 1\frac{1}{2} = \frac{1}{2}, \quad 1\frac{1}{2} = \frac{1}{2},$$

d. h. hätten wir uns auf dieselbe Zahl von Leukocyten beschränkt wie Wright, so hätten wir, je nachdem wir auf diese oder jene Stelle des Präparates gestoßen wären, statt  $1\frac{1}{2}$  (genauer  $1\frac{1}{2}$ ) ganz andere Werte erhalten, von denen der kleinste  $= \frac{1}{2}$ , d. h. 8mal kleiner, der größte  $= 4$ , d. h. etwa  $2\frac{1}{2}$ mal größer gewesen wäre als unser Mittelwert.

#### Beispiel II.

Phagocytose von Staphylokokken in aktivem Serum (aus demselben Versuch wie Beispiel I): Gezählt 60 Leukocyten. Diese enthielten:

$3 \times 0$ Bakterien	$1 \times 8$ Bakterien	$1 \times 18$ Bakterien
$1 \times 1$ "	$1 \times 9$ "	$19 \times 20$ "
$1 \times 2$ "	$8 \times 10$ "	$6 \times 25$ "
$1 \times 4$ "	$7 \times 12$ "	$3 \times 30$ " 1)
$3 \times 6$ "	$6 \times 15$ "	

Durchschnittswert für die Gesamtmasse  $\frac{300}{20} = 15$ , Durchschnittswert für die ersten 20, zweiten 20, dritten 20 Leukocyten  $\frac{200}{20} = 14$ ,  $\frac{300}{20} = 16$ ,  $\frac{300}{20} = 15$ .

1) Die höheren Zahlen sind Annäherungswerte; eine ganz genaue Zählung ist oft schon bei etwa 10 Bakterien, bei mehr als 15 fast immer unmöglich.



Hier sind die Unterschiede der Einzeldurchschnitte viel weniger groß: 14, 16, 15; der eine ist der Durchschnitt der beiden anderen, und diese beiden sind von dem einen nur um wenig entfernt.

Die beiden Beispiele sind nun insofern typisch, als ganz im allgemeinen bei starker Phagocytose schon eine geringere Zahl von Zählungen einen verhältnismäßig zuverlässigen Durchschnitt ergibt, bei schwacher aber sehr ausgedehnte Zählungen nötig sind, um den Einfluß des Zufalles auszuschalten. Besonders zu fürchten ist letzterer, wo es sich — bei ungünstigen, d. h. der Phagocytose widrigen Bedingungen — um sehr leicht phagocytable Bakterien, wie etwa den Staphylococcus, handelt; denn fast nur in diesem Falle kommen bei im allgemeinen sehr geringer Phagocytose vereinzelte starkgefüllte Zellen vor; ähnliches trifft zu, wo umgekehrt die Phagocytose auch im günstigsten Falle sehr gering ist, so etwa bei gewissen Milzbrandstämmen.

Das zeigt nachstehende Tabelle, in der außer den schon wiedergegebenen Zahlen für den Staphylococcus entsprechende für 3 andere Typen zusammengestellt sind.

Beispiel III.

Staphylococcus in NaCl	$\frac{38}{20}$	$\frac{77}{20}$	$\frac{18}{20}$	$\frac{38}{20}$	$\frac{18}{20}$	$\frac{4}{20}$	$\frac{171}{20} = \frac{8\frac{1}{2}}{20}$
in Serum	$\frac{280}{20}$	$\frac{284}{20}$	$\frac{300}{20}$				$\frac{904}{20} = \frac{45\frac{2}{5}}{20}$
Typhusbacillus in NaCl	$\frac{18}{20}$	$\frac{70}{20}$	$\frac{18}{20}$	$\frac{70}{20}$	$\frac{18}{20}$	$\frac{18}{20}$	$\frac{184}{20} = \frac{9\frac{2}{5}}{20}$
in Serum	$\frac{88}{20}$	$\frac{57}{20}$	$\frac{101}{20}$	$\frac{88}{20}$	$\frac{88}{20}$		$\frac{488}{20} = \frac{24\frac{4}{5}}{20}$
Cholera vibrio in NaCl	$\frac{88}{20}$	$\frac{88}{20}$	$\frac{102}{20}$	$\frac{88}{20}$	$\frac{102}{20}$		$\frac{506}{20} = \frac{25\frac{3}{10}}{20}$
in Serum	$\frac{142}{20}$	$\frac{131}{20}$	$\frac{61}{20}$	$\frac{72}{20}$	$\frac{104}{20}$		$\frac{510}{20} = \frac{25\frac{5}{10}}{20}$
Milzbrandbacillus in NaCl	$\frac{10}{20}$	$\frac{11}{20}$	$\frac{5}{20}$	$\frac{5}{20}$	$\frac{10}{20}$	$\frac{5}{20}$	$\frac{120}{20} = \frac{6}{20}$
in Serum	$\frac{3}{20}$	$\frac{18}{20}$	$\frac{0}{20}$	$\frac{10}{20}$	$\frac{6}{20}$	$\frac{14}{20}$	$\frac{160}{20} = \frac{8}{20}$

Die Extreme der Einzeldurchschnitte, wie die Gesamtdurchschnitte, sind unterstrichen. Alle Durchschnitte sind als Brüche angeschrieben, deren Zähler die Zahl der aufgenommenen Bakterien, deren Nenner die Zahl der ausgezählten Zellen (immer 20) angibt; der Gesamtdurchschnitt ist natürlich, der besseren Vergleichbarkeit halber, auf den Nenner 20 umgerechnet.

Die bisherigen Beispiele geben von der Unsicherheit der Ergebnisse eine ungefähre Vorstellung. Die Wichtigkeit der Sache rechtfertigt es wohl, wenn ich an einem weiteren Beispiel zeige, daß auch Bakterien von ganz anderer systematischer Stellung demselben Gesetz unterliegen, wenn ich ferner an

Hand desselben Beispiels, das sich dank relativ gleichmäßiger Phagocytose als Prototyp besonders eignet, auch eine genaue Feststellung des mittleren Fehlers gebe.

Es handelt sich diesmal um einen Versuch mit Diphtheriebacillen.

Beispiel IV.

Diphtheriebacillen in je 20 Leukocyten:

bei D 14: 42, 42, 42, 58, 19, 59	} Ser. in akt. Serum	39, 53, 12, 25, 32, 69
„ D 35: 76, 74, 135, 46, 101, 120 etc.		136, 139, 98, 140, 140
„ D 58: 24, 58, 27, 48, 30, 28 „		57, 79, 82, 205, 50, 86 etc.
„ D 64: 37, 51, 42, 51, 123, 78 „		175, 180, 198, 85, 179, 136 „
„ D m: 14, 61, 66, 47, 40, 48 „		80, 63, 116, 93, 67, 94 „

In fast allen diesen Reihen sind die Differenzen für die verschiedenen Leukocytengruppen recht beträchtlich; die größte Zahl übertrifft die kleinste um das 3-,  $5\frac{1}{2}$ -, 3-,  $1\frac{1}{2}$ -,  $2\frac{1}{2}$ -, 4-,  $3\frac{1}{2}$ -,  $2\frac{1}{2}$ -,  $4\frac{1}{2}$ -,  $1\frac{1}{2}$ -fache; eine genauere Berechnung ergibt für Gruppen von je 20 Leukocyten eine mittlere Abweichung (gegenüber dem Gesamtdurchschnitt von  $120 = 6 \times 20$  Leukocyten) von

Reihe	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Index	25 %	40 %	30 %	40 %	30 %	40 %	30 %	20 %	30 %	20 %
also	3-mal	40 %	4-mal	30 %	1-mal	25 %	2-mal	20 %	oder durchschnittlich	einen mittleren Fehler von 30 %.

Wie weit der Durchschnittswert aus großen Leukocytenmengen (von 120 und mehr, selten weniger Zellen), wie er in dieser Arbeit durchweg verwendet wird, vom absolut richtigen abweicht, kann ich nicht mit voller Bestimmtheit sagen; daß der mittlere Fehler desto kleiner, je größer die Anzahl der ausgezählten Leukocyten ist, versteht sich von selbst; ein annäherndes Urteil erlaubt folgende Berechnung:

Fassen wir die Leukocyten in Gruppen von 60 statt in solche von 20 zusammen, so bekommen wir für jede der 10 obenstehenden Reihen statt 6 Werte deren 2; berechnet man für diese 2 Werte die Abweichung vom Gesamtdurchschnitt, die dem vorhin berechneten mittleren Fehler entspricht, so bekommt man schon viel kleinere Beträge als vorhin, wie folgende Tabelle zeigt:

Mittlerer Fehler in % bei Berechnung des phagocytären Index durch Auszählen.

Reihe	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
v. 20 Leukoc.	25	40	30	40	30	40	30	20	30	20
„ 60 „	<4	<8	>5	6	<1½	<22	>30	16	>2	1
Im Durchschnitt bei 20 Leukoc.	$\frac{305}{10} = 31\%$ ; bei 60 Leukoc. $\frac{101}{10} = 10\frac{1}{2}\%$ .									

Schon durch Ausdehnung des Auszählens von 20 auf 60 Leukocyten geht der Durchschnitt des mittleren Fehlers — bei Annahme des Index aus 120 Zellen als Norm — von rund 30 Proz. auf 10 Proz.; wir dürfen also annehmen, daß das Ergebnis beim Auszählen von 120 Zellen statt bloß 60 sich dem wahren Wert stark nähert, von ihm nur noch um einen Fehlbetrag von etwa 5 Proz. entfernt bleibt; aber, wir betonen dies, nur im Durchschnitt. In einzelnen Fällen (oben in 3 von 10) schützt auch das Auszählen größerer Mengen von Zellen nicht gegen ziemlich erhebliche Fehler (bei 60 Zellen noch von über 30 Proz. [32 Proz.]).

So liegen die Verhältnisse bei Bakterienarten, die einer verhältnismäßig gleichförmigen Phagocytose unterliegen. Bei den oben kurz charakterisierten Arten mit ungleichförmiger Phagocytose sind die möglichen Fehler noch größer.

So ergab sich in einem Versuch (vom 30. III. 1907, Leuk. I) als mittlerer Fehler bei Berechnung des phagocytären Index bei Auszählen

	von nur 20 Leukocyten	von 60 Leukocyten
für Staphylokokk. I (in NaCl)	66 %	6 %
II (akt. Ser.)	12 %	< 13 %
III (in NaCl)	88 %	25 %
IV (akt. Ser.)	106 %	58 %
für Milzbrandbac. I (in NaCl)	80 %	75 %
II (inakt. Ser.)	60 %	30 %
III (in NaCl)	40 %	19 %
IV (inakt. Ser.)	10 %	< 3 %
im Durchschnitt		
für Staphylokokken	68 %	25½ %
„ Milzbrandbacillen	47½ %	32 %
„ beide zusammen	< 58 %	> 28½ %

Auch hier wurde das Resultat bei Auszählung größerer Zellenmengen erheblich verbessert, wenn auch nicht im selben Grade wie beim Diphtheriebacillus.

Eine weitere Frage, die hierher gehört, ist die nach dem zeitlichen Verlauf der Phagocytose. Will man in einem Phagocytoseversuch nur einige wenige Versuchsbedingungen in ihrem Einfluß auf den Grad der Phagocytose unter sich vergleichen, wie dies bisher — bei anderen Autoren — meist der Fall war, so kommt diese Frage freilich kaum in Betracht. Nimmt aber ein einzelner Versuch sehr große

Dimensionen ein, oder wünscht man verschiedene Versuche unter sich vergleichen zu können, so muß auf das zeitliche Moment geachtet werden. Um Vergleichbarkeit verschiedener Versuche zu erreichen, muß natürlich die Versuchsdauer immer dieselbe sein. Weniger einfach ist die Auskunft für den ersten Fall. Man stelle sich die Lage in concreto vor. Meine Versuche waren, ausgenommen die Vorversuche, so groß, daß allein das Ausstreichen der Röhrchen eine halbe Stunde erforderte. Es war also die Phagocytose bloß in denjenigen Röhrchen, die zuerst zur Verarbeitung kamen, wirklich nur die beabsichtigte Zeit hindurch vor sich gegangen, in den zuletzt verarbeiteten aber doppelt so lange, freilich in der zweiten halben Stunde bei Zimmertemperatur (wenigstens, nachdem die Abkühlung des Röhrchens eingetreten war, was bei dem geringen Volum von Gefäß und Inhalt sehr rasch geschehen mußte). Es war somit zu untersuchen, wie weit das Ergebnis von der verschiedenen Dauer der Phagocytose beeinflußt werden kann.

Es liegt übrigens in der Literatur eine Erfahrung vor, die dem fraglichen Punkt große Bedeutung verleiht, ich meine die Beobachtungen von Bordet (Annales Pasteur, 1897) über die „*crise phagocytaire*“; nach diesen Beobachtungen können im Tierkörper Bakterien und Leukocyten lange Zeit in Berührung sein, ohne in sichtbare Beziehungen treten; plötzlich aber tritt eine allgemeine und starke Phagocytose ein. Neuerdings hat bei typischen Opsoninversuchen in vitro Löhlein wertvolle Angaben über die Zunahme der Phagocytose bei längerer Bebrütung gemacht (s. p. 742 meines kritischen Referates).

Leider wies der Versuch, der hier Aufschluß geben sollte, dank seiner großen Komplikation, im Ergebnis gerade an der Stelle, die für das vorliegende Problem entscheidend war, eine Lücke auf, wie ein Blick auf nachstehende Tabelle zeigt (von der erwähnten Komplikation wird noch die Rede sein). Daß es einen sehr großen Unterschied macht, ob Zellen und Bakterien kurz oder lang in Berührung sind, wird hier freilich deutlich genug; nur bezieht sich die Differenz der Indices auf einen sehr großen Zeitunterschied ( $\frac{1}{4}$  Stunde 16 Stunden), und gerade über den Verlauf innerhalb der und ersten Stunde, der uns am meisten interessierte, erfahren wir nichts.

Tabelle I. Versuch 1

Variationen des Grundversuchs			Staphylokokken	
Medium der Phagocytose	Material der Phagocytose	Dauer der Phagocytose	ohne Serum	mit Serum
Kochsalzlösung	Bakterienmenge normal	nach 30 Min.	$\frac{171}{120} = 1,43$	$\frac{204}{130} = 15,07$
Citratlösung (hypertonisch!)	Bakterienmenge normal	„ 12 „	$\frac{47}{200} = 0,24$	$\frac{182}{120} = 1,52$
		„ 30 „	—	—
		„ 16 Std.	$\frac{191}{110} = 16,85$	$\frac{184}{110} = 25,73$
	Bakterienmenge verdünnt	„ 30 Min.	$\frac{50}{200} = 0,03$	$\frac{164}{110} = 0,34$
		„ 16 Std.	$\frac{45}{110} = 0,31$	$\frac{116}{110} = 12,70$

Ich bin nicht dazu gekommen, die Lücke auszufüllen. Die Bewertung der weiteren Versuche wird jedoch hiervon kaum berührt; denn ich habe (mit wenigen Ausnahmen, die unten genannt werden sollen) darauf gesehen, daß immer diejenigen Röhrchen, in denen aller Voraussicht nach die Phagocytose am raschesten vor sich gehen mußte, zuerst, diejenigen Röhrchen aber, bei denen das Gegenteil der Fall sein mußte, zuletzt ausgestrichen wurden. So ist der Einfluß des Zeitmomentes zwar nicht überhaupt ausgeschaltet worden, aber es wurde doch verhütet, daß er sich zugunsten unserer theoretischen Voraussetzungen geltend machte.

In das Kapitel der Methodik gehört endlich die Frage, inwieweit die **Individualität der Versuchstiere**, die die Leukocyten und das Serum liefern, eine Rolle spielt. Da wir wissen (s. l. c.), daß Versuche auch beim Tier in vivo je nach dem Individuum ceteris paribus recht verschieden ausfallen können, muß man mit der Möglichkeit eines Einflusses individueller Unterschiede auch beim Versuch in vitro rechnen.

Wennschon man gewisse Verhältnisse, wie den Unterschied der Phagocytose in Proben eines und desselben Serums, von denen die eine aktiv, die andere inaktiviert ist, sehr wohl feststellen kann, ohne den genannten Einfluß fürchten zu müssen, so ist es doch, bevor diese Frage entschieden ist, nicht möglich, sich ein Urteil über die Vergleichbarkeit verschiedener Versuche, bzw. über die Zuverlässigkeit zu bilden, mit der aus einem einzigen Versuche Schlüsse von allgemeiner Geltung gezogen werden können.

(vom 25. V. 1907).

Typhusbacillen		Cholera vibrionen		Milzbrandbacillen	
ohne Serum	mit Serum	ohne Serum	mit Serum	ohne Serum	mit Serum
$\frac{104}{120} = 0,53$	$\frac{422}{100} = 4,26$	$\frac{505}{100} = 5,05$	$\frac{530}{100} = 5,30$	$\frac{28}{120} = 0,24$	$\frac{68}{120} = 0,55$
$\frac{24}{200} = 0,02$	$\frac{28}{200} = 0,04$	$\frac{22}{140} = 0,17$	$\frac{24}{100} = 0,24$	$\frac{10}{200} < 0,10$	$\frac{6}{200} = 0,03$
$\frac{122}{120} = 0,90$	$\frac{134}{120} = 0,78$	—	—	$\frac{24}{120} = 0,26$	$\frac{34}{120} = 0,60$
$\frac{7}{200} = 0,04$	$\frac{11}{200} = 0,06$	$\frac{33}{140} = 0,24$	$\frac{29}{100} = 0,29$	$\frac{11}{160} = 0,13$	$\frac{10}{160} = 0,06$
$\frac{37}{140} = 0,27$	$\frac{77}{140} = 0,55$	—	—	$\frac{16}{200} = 0,08$	$\frac{7}{160} = 0,17$

Versuch IV, der hier Aufschluß geben sollte, ist mit 3 Serumproben, deren jede von einem besonderen Tiere stammt, und 2 Leukocytenproben, wieder jede von einem besonderen Tiere stammend, angestellt.

Das Ergebnis des Versuches ist außer in nachstehender Tabelle noch in Fig. 1 (s. Figurenerklärung) graphisch wiedergegeben.

Zu dem Versuche ist zu bemerken, daß der Indexberechnung die üblichen ausgedehnten Zählungen zugrunde liegen (meist von 100 oder 120, hier und da von mehr, nur selten von weniger Zellen, ausgenommen die Indices für den Cholera vibrio; für sie wurden meist nur 60, zweimal 80, einmal 100 Zellen gezählt; es kommt das daher, daß die Zählung in Präparaten mit Cholera vibrionen besonders schwer ist, weil hier erstens die Bakterien infolge geringerer Färbbarkeit, besonders aber wegen der häufigen morphologischen Veränderungen (intracellulärer Auflösung) weit schwerer zu erkennen sind, als andere; dann aber auch, weil gerade durch den Choleraerreger die Leukocyten am leichtesten geschädigt und dadurch undeutlich werden (vermutlich durch die starken Gifte). Wir kommen hierauf zurück.

Aus Fig. 1, p. 740, ersieht man, daß von den vier hier untersuchten Bakterienarten: Staphylococcus, Typhusbacillus, Cholera vibrio und Milzbrandbacillus alle dem Wrightschen Satze entsprechen, daß eine erhebliche Phagocytose nur unter Mitwirkung aktiven Serums zustande kommt. Am deutlichsten ist dies beim Staphylococcus, dann beim Typhus; bei Cholera ergibt auch der Zusatz von inaktivem Serum einen deutlichen Ausschlag, wenn schon meist einen viel geringeren als der von aktivem; beim Milzbrand bleibt umgekehrt die Wirkung auch von aktivem Serum gering.

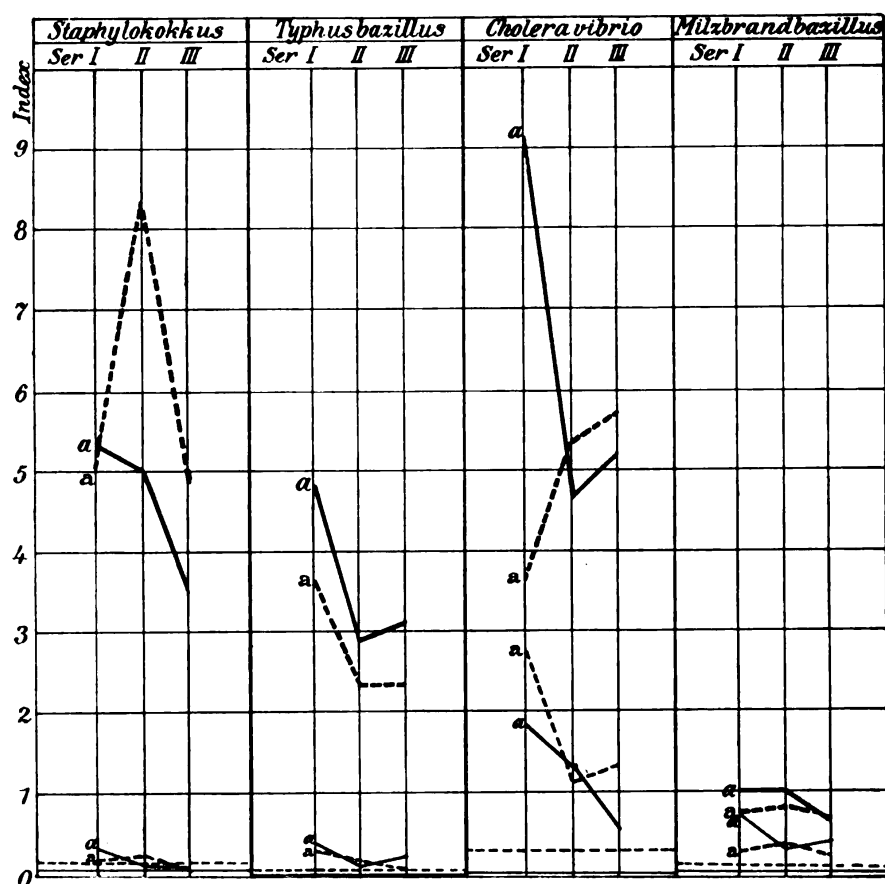


Fig. 1. Versuch mit dem Staphylococcus-, Typhus-, Cholera- und Milzbranderreger. (Einfluß individuell verschiedener Sera und Leukocyten !)

- erhalten mit Leukocyten a und aktivem Serum
- erhalten mit Leukocyten a und inaktivem Serum
- erhalten mit Leukocyten a und physiol. Lösung
- erhalten mit Leukocyten a und aktivem Serum
- erhalten mit Leukocyten a und inaktivem Serum
- erhalten mit Leukocyten a und physiol. Lösung

Tabelle II.

	Staphylokokken			Typhusbacillen			Cholera vibrien			Milzbrandbacillen		
	Leuko- cyten I	Leuko- cyten II	Leuko- cyten III	Leuko- cyten I	Leuko- cyten II	Leuko- cyten III	Leuko- cyten I	Leuko- cyten II	Leuko- cyten III	Leuko- cyten I	Leuko- cyten II	Leuko- cyten III
Versuch II vom 30. III. 1907 b.												
Physiol. Salzlösung	$\frac{1}{100} = 0,61$	—	—	$\frac{1}{100} = 0,15$	—	—	$\frac{1}{100} = 0,03$	—	—	$\frac{1}{100} = 0,15$	—	—
Aktives Serum	$\frac{1}{100} = 15,85$	—	—	$\frac{1}{100} = 3,22$	—	—	$\frac{1}{100} = 0,12$	—	—	$\frac{1}{100} = 0,91$	—	—
Versuch III vom 30. III. 1907 a.												
Physiol. Salzlösung	$\frac{1}{100} = 0,41$	$\frac{1}{100} = 0,30$	$\frac{1}{100} = 1,23$	$\frac{1}{100} = 0,14$	$\frac{1}{100} = 0,08$	$\frac{1}{100} = 0,32$	—	—	—	$\frac{1}{100} = 3,76$	$\frac{1}{100} = 0,17$	$\frac{1}{100} = 3,33$
Aktives Serum	$\frac{1}{100} = 18,48$	$\frac{1}{100} = 3,61$	$\frac{1}{100} = 14,33$	—	$\frac{1}{100} = 2,17$	$\frac{1}{100} = 5,49$	—	—	—	$\frac{1}{100} = 5,62$	$\frac{1}{100} = 0,97$	$\frac{1}{100} = 3,65$
Versuch IV vom 12. IX. 1907												
Physiol. Salzlösung	$\frac{1}{100} = 0,06$	$\frac{1}{100} = 0,15$	—	$\frac{1}{100} = 0$	$\frac{1}{100} = 0,07$	—	$\frac{1}{100} = 0,02$	$\frac{1}{100} = 0,32$	—	$\frac{1}{100} = 0,06$	$\frac{1}{100} = 0,11$	—
Serum I, inaktiviert	$\frac{1}{100} = 0,31$	$\frac{1}{100} = 0,17$	—	$\frac{1}{100} = 0,36$	$\frac{1}{100} = 0,27$	—	$\frac{1}{100} = 1,85$	$\frac{1}{100} = 2,82$	—	$\frac{1}{100} = 0,81$	$\frac{1}{100} = 0,33$	—
Serum I, aktiv	$\frac{1}{100} = 4,26$	$\frac{1}{100} = 4,99$	—	$\frac{1}{100} = 4,84$	$\frac{1}{100} = 3,71$	—	$\frac{1}{100} = 9,08$	$\frac{1}{100} = 3,70$	—	$\frac{1}{100} = 1,09$	$\frac{1}{100} = 0,70$	—
Serum II, inaktiviert	$\frac{1}{100} = 0,09$	$\frac{1}{100} = 0,21$	—	$\frac{1}{100} = 0,08$	$\frac{1}{100} = 0,15$	—	$\frac{1}{100} = 1,32$	$\frac{1}{100} = 1,17$	—	$\frac{1}{100} = 0,35$	$\frac{1}{100} = 0,38$	—
Serum II, aktiv	$\frac{1}{100} = 5,05$	$\frac{1}{100} = 8,38$	—	$\frac{1}{100} = 2,94$	$\frac{1}{100} = 2,34$	—	$\frac{1}{100} = 4,41$	$\frac{1}{100} = 5,42$	—	$\frac{1}{100} = 0,99$	$\frac{1}{100} = 0,83$	—
Serum III, inaktiviert	$\frac{1}{100} = 0,07$	$\frac{1}{100} = 0,04$	—	$\frac{1}{100} = 0,19$	$\frac{1}{100} = 0,03$	—	$\frac{1}{100} = 0,60$	$\frac{1}{100} = 1,40$	—	$\frac{1}{100} = 0,42$	$\frac{1}{100} = 0,23$	—
Serum III, aktiv	$\frac{1}{100} = 3,42$	$\frac{1}{100} = 3,89$	—	$\frac{1}{100} = 3,09$	$\frac{1}{100} = 2,33$	—	$\frac{1}{100} = 4,94$	$\frac{1}{100} = 5,77$	—	$\frac{1}{100} = 0,66$	$\frac{1}{100} = 0,11$	—



Ich bemerke, ohne darauf zunächst Gewicht zu legen, daß im vorliegenden Versuch der Grad der Phagocytose dem Grade der Virulenz annähernd parallel ging. Vom Staphylococcus töteten etwa 2—3 Oesen (von etwa 6 mg) ein mittleres Meerschweinchen, von Typhus und Cholera  $\frac{1}{2}$ —1 Oese, vom Milzbrand kleinere Bruchteile einer Oese (groß war die Virulenz zur Zeit der Versuche nicht;  $\frac{1}{10}$  Oese tötete erst in einigen Tagen; die Grenze lag etwa bei  $\frac{1}{50}$ ).

Was nun den Gesichtspunkt betrifft, der hier interessiert, so sieht man aus der Tafel leicht, daß die Art des Serums und der Leukocyten im allgemeinen von geringer Bedeutung ist.

Besonders die Werte, die ein und dasselbe Serum mit den beiden Leukocytenarten (natürlich bei Verwendung ein und desselben Bakteriums) ergibt, liegen — um nur den Fall des Zusatzes von aktivem Serum, auf den es besonders ankommt, zu erwähnen — in 10 von 12 Fällen so nahe beisammen, daß die Differenz sich innerhalb der wahrscheinlichen Fehlergrenze hält; nur 2mal ist die Differenz größer, 1mal für Serum II und Staphylokokken, 1mal für Serum I und Choleravibrionen.

Die Werte freilich, die wir umgekehrt mit ein und derselben Leukocytenart bei Zusatz der verschiedenen Serumarten erhalten, zeigen stärkere Abweichungen, und zwar ist hier eine gewisse Regelmäßigkeit nicht zu verkennen. Serum I übertrifft in 5 von 8 Fällen die anderen beiden Sera, in weiteren 2 Fällen wenigstens das eine von ihnen; nur in 1 Falle, im Choleraversuche, bleibt die eine Leukocytenprobe mit Serum I hinter den beiden anderen Seris zurück, und zwar nicht ganz unbeträchtlich (in den Röhrchen mit inaktivem Serum zeigt der Choleraversuch die Prävalenz des Serums I für beide Leukocytenarten!).

Im ganzen stimmen die verschiedenen Teilversuche, die in Versuch III enthalten sind, immerhin so weit überein, daß aus ihnen übereinstimmende Sätze abgeleitet werden können: im einzelnen treten aber doch auch Unregelmäßigkeiten zutage, die davor warnen müssen, Schlüsse von großer Tragweite aus einem einzigen Versuch zu ziehen.

Wir kommen zur

#### Kritik der Technik.

Es ist schon daran erinnert worden, daß der Phagocytoseversuch in verschiedenen Formen aufgetreten ist. Die Entwicklung seiner Technik habe ich in meinem wiederholt zitierten Werke dargestellt. Wie ich selbst ihn anstellte, kam oben zur Sprache. Daß scheinbar geringfügige Modifikationen der Technik von großer Bedeutung werden können, haben

schon die Arbeiten von Wright selbst, dann besonders von Hektoen und Löhlein gezeigt; es berichteten darüber p. 738 ff. meines Buches. Von den Feststellungen dieser Autoren interessieren besonders die über den Einfluß des Salzgehaltes der Ingredienzien des Phagocytoseversuches auf den Verlauf der Phagocytose (vergl. l. c. p. 743 ff.).

Aus ihnen geht hervor, daß die Veränderung des osmotischen Gesamtdrucks um Zehntel eines Prozentes (auf Kochsalz berechnet) schon eine deutliche Aenderung des Index bedingt.

Ich hatte nun beim Beginn meiner Experimente die Erfahrung gemacht, daß sich die Verwendung reiner (physiologischer) Kochsalzlösung für die geplanten Versuche nicht empfiehlt. Erstens tritt bei Anwendung dieser Salzlösung im Exsudat, das die Leukocyten liefern soll, öfter, trotz ziemlich starker Verdünnung (s. unten Schilderung meiner Technik), Gerinnung ein, noch bevor die Leukocyten abzentrifugiert sind; zweitens kommt in den Röhrchen, wo man die Phagocytose sich abspielen läßt, eine Verklumpung der Leukocyten zustande, die die Herstellung guter Präparate beeinträchtigt und so die Zählung sehr erschwert und unsicher macht.

Wright hat nun in seinen ersten Arbeiten, wo er Blutleukocyten verwendete, als Mittel zur Verhütung der Blutgerinnung „physiologische Lösung mit 1 Proz. Natriumcitrat“ empfohlen; leider ist nirgends angegeben, ob er darunter versteht 1) physiologische Kochsalzlösung mit einem Zusatz von 1 Proz. Citrat oder 2) eine Lösung von 1 Proz. Citrat, die durch Kochsalz zu einer „physiologischen“, d. h. einer Lösung mit 0,85 Proz. Kochsalzspannung ergänzt ist.

Ich habe mit beiderlei Lösungen Versuche angestellt. Die hypertonische Lösung erwies sich als ungeeignet, besonders wo es sich um Bakterien von großer Empfindlichkeit und starkem Giftgehalt, wie Choleravibrionen, handelt. Diese lösen sich zum großen Teil auf, geben dabei Gifte ab, und schädigen, ja zerstören die Phagocyten. (NB. Eine mikroskopisch sehr starke Veränderung schließt Erholung der Zellen nicht aus! Vergl. Versuch IV: Bei Verwendung reichlicher Bakterien, somit der Möglichkeit reichlicher Giftbefreiung, ziemlich frühe vorübergehende Schädigung durch alle Bakterien, dauernde durch Cholera; bei spärlicher Einsaat späte, wohl dauernde Schädigung nur durch Cholera!)

Es wurde daher zu den Hauptversuchen, soweit sie nicht (die ersten) mit reiner NaCl-Lösung unternommen sind, nur noch die isotonische Kochsalzcitratlösung verwendet, wie sie unten gekennzeichnet ist (p. 747 unten).

Inwieweit dieser Lösung wirklich ganz dieselbe Indifferenz eignet, wie sie der reinen Kochsalzlösung zugeschrieben wird, d. h. ob der Ersatz eines Teils des Kochsalzes durch Citrat wirklich gleichgültig ist, kann ich nach den Erfahrungen, über die ich verfüge, mit Bestimmtheit nicht sagen. Ganz indifferent ist sie nicht, dessen hat mich eine späte üble Erfahrung belehrt. Am Schlusse meiner Untersuchungen wollte ich durch einen sehr ausgedehnten Versuch verschiedene Ergebnisse einer Kontrolle unterziehen. Die Vorbereitungen zum Versuch, d. h. die Herstellung der Bakterienaufschwemmungen, der Serummischungen usw., die Vorbereitung der Tiere zogen sich so lange hin, daß, mit Rücksicht auf die Assistenz, die Ausführung selbst auf nach Mittag verlegt werden mußte. Zwischen dem Ansetzen der Bakterienaufschwemmungen und ihrer Verwendung verflossen so etwa  $3\frac{1}{2}$  Stunden, statt 1 bis  $1\frac{1}{2}$ , wie sonst. Der ganze Versuch erwies sich nun als verloren, indem die Zahl der Bakterien in den Präparaten, trotz gleicher Ausgangsmenge, wie sonst, eine so außerordentlich geringe war, daß auf ein Ergebnis, das sich mit den früheren hätte vergleichen lassen, nicht gerechnet werden konnte.

Sehr deutlich trat die destruktive Wirkung — und nur um eine solche kann es sich gehandelt haben — auch in mehreren Versuchen hervor, wo die verschiedenen Flüssigkeiten, die zum Phagocytoseversuch gedient hatten, nach dem bekannten Plattenverfahren auf lytische Eigenschaften untersucht werden sollten.

Es ist also ganz allgemein bei meinen Versuchen mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Bakterien und die Zellen einer gewissen Schädigung seitens der Citratlösung ausgesetzt gewesen sind, daß also die Resultate von denen etwas abweichen, die man mit reiner Kochsalzlösung erhalten hätte (wenn es nicht etwa so steht, daß auch diese Lösung nicht völlig indifferent ist).

Daß es sich dabei aber höchstens um quantitative Einflüsse gehandelt haben kann, geht mit Bestimmtheit schon aus Versuch I, sowie aus der wesentlichen Uebereinstimmung zwischen Versuchen mit Citrat- und solchen mit reiner Kochsalzlösung hervor, mit größter Wahrscheinlichkeit auch aus der Tatsache, daß die Citratversuche alle Eigentümlichkeiten

zeigten, die nach der Versuchsanordnung unter Voraussetzung einer indifferenten Verdünnungsflüssigkeit erwartet werden konnten.

Auf einen weiteren technischen Faktor von großer Bedeutung bin ich, sehr zu meinem Schaden, erst bei einer Reihe großer Kontrollversuche aufmerksam geworden, durch die ich die Unsicherheiten, die manchen meiner Ergebnisse anhafteten, zu beseitigen gedachte.

Zwei dieser Versuche verliefen gänzlich ergebnislos, d. h. in keinem der etwa 120 Präparate, die unter den verschiedensten Bedingungen, ganz wie in den früheren Versuchen, gewonnen worden waren, war auch nur eine Spur von Phagocytose zu finden. Die Ursache, die wir für ein ähnliches Mißlingen oben verantwortlich machten, kam hier nicht in Betracht; vielmehr scheint mir die Erklärung für diese beiden Fälle diese zu sein:

Bei der Blutentnahme aus der Carotis, die das Serum liefern sollte, bin ich beidemale für etwa eine Viertelstunde abgerufen worden; während dieser Zeit atmete das Tier wider meine Absicht ununterbrochen den Aether ein, den ich ihm, wie meist, zur Erzielung einer leichten Betäubung für ein paar Augenblicke vorgelegt hatte.

Beim zweiten Versuch, wo ich, verblüfft durch den Ausfall des ersten Versuches, überall nach einer Fehlerquelle suchte, bemerkte ich denn auch noch vor Beginn des Versuches, daß das Serum sehr deutlich nach Aether roch; ich setzte es für die Zeit, die bis zum Beginn des Versuches noch übrig war, d. h. für etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde, in dünner Schicht bei  $37^{\circ}$  der Verdunstung aus; leider ohne Erfolg.

Es unterliegt für mich keinem Zweifel, daß der Uebergang des Aethers ins Blut am Mißlingen der Versuche die Schuld hat, indem er im Versuch zu einer Lähmung der Leukocyten führte.

Diese Beobachtung, so peinlich sie für mich in einem Augenblick war, wo mir die abgemessene Zeit der Ferien und die letzten Reste meiner Reagentien zur Verfügung standen, schien mir doch von großem Wert zu sein.

Man hat vor längerer Zeit dem Problem der Phagocytose durch Versuche mit Narcotica beizukommen gesucht, doch nur in vivo; hat den Versuchen aber dann doch wenig Wert beigemessen, weil in den Nebenwirkungen der Narcotica, insbesondere der Wirkung auf Nervenzellen und den Kreislauf, eine zu große Komplikation gegeben schien.

Meine Beobachtung zeigt uns aber den Weg, dem erstrebten Ziele sicherer nahe zu kommen. Sie scheint mir

aber auch für die Beurteilung nichtexperimenteller Verhältnisse — ich meine die Vorgänge im narkotisierten Menschen — von Bedeutung.

Eine Vergleichung verschiedener Narcotica, insbesondere Aether, Chloroform und Alkohol in Versuchen, die den beiden in Frage stehenden analog oder auch mit Mischung von Narcoticum und Serum außerhalb des Körpers — was ein quantitatives Arbeiten ermöglichte — anzustellen wären, dürfte sich lohnen.

## 2. Beschreibung der angewandten Technik.

Die Technik ist in verschiedenen Modifikationen aufgetreten (man vergl. l. c. p. 716 ff.). Jetzt dürfte es ziemlich allgemein üblich sein, reine (gewaschene) Leukocyten und Bakterien, beide in physiologischer Lösung aufgeschwemmt, sowie Serum und allfällige weitere Zusätze (wie etwa Aggressin) in kleinen Glasröhrchen, wie beim bakteriolytischen Versuche, tropfenweise zu mischen.

Meine Technik war folgende:

I. Die **Bakterien** wurden mit wenigen Ausnahmen, die sofort erwähnt werden sollen, von festem Nährboden, und zwar, ausgenommen die Versuche mit Staphylokokken, Typhusbacillen, Choleravibrionen und Milzbrandbacillen, wo Agar zur Verwendung kam, von Löfflerschem (Pferde-) Serum gewonnen, nachdem sie meist 20 Stunden (selten etwas länger) bei ungefähr 36° gewachsen waren.

Sie wurden in physiologischer Natriumcitratlösung, anfangs (bei Versuchen) auch gewöhnlicher physiologischer Lösung (Zusammensetzung der Citratlösung am Ende dieses Abschnittes angegeben) aufgeschwemmt, und zwar meist etwa 6 mg in 1 ccm. (Waren die Bakterienmassen schwer zu zerteilen, so wurde mehr verwendet, so daß annähernd der gleiche Grad der Trübung wie bei gut zerteilbarem Material entstand [schlecht zerteilbar waren die Beläge der Cholera — früher war derselbe Stamm in ganz weichen Massen gewachsen —, des Milzbrandes, einiger Diphtherie- und, in verschiedenem Grade, aller Streptokokkenstämme].) Die Streptokokken wurden in den meisten Versuchen durch Absitzenlassen oder Zentrifugieren aus 24—48-stündigen Bouillonkulturen gewonnen und nach Schätzung auf den üblichen Grad der Dichtigkeit gebracht.

II. Die **Leukocyten** (wie das Serum) wurden von Meerschweinchen gewonnen (in den früheren Versuchen von größeren, im Gewicht von etwa 600 g, später von jüngeren, 300—400 g schweren, da sie mir hier leichter zu gewinnen zu sein schienen). Die Tiere wurden meist etwa 15 Stunden vor dem Versuch (selten nur 9) mit etwa 10 ccm (je nach der Größe etwas

mehr oder weniger) auf 37° erwärmter Bouillon (typische Peptonbouillon) intraperitoneal injiziert. Unmittelbar vor dem Versuch wurde 10 cem körperwarmer Citratlösung nachgespritzt, dann das Exsudat mittels Glaskapillare entnommen (selten nach Tötung des Tieres und Eröffnung der Bauchhöhle gewonnen). Das Exsudat wurde sogleich, bei der Entnahme, noch mit annähernd der gleichen Menge Citratlösung verdünnt, um sicher die Gerinnung zu vermeiden; dann wurde zentrifugiert (Klärung in etwa 10 Minuten), die Flüssigkeit abgegossen; hierauf dreimal gewaschen, wiederum mit — meist körperwarmer — Citratlösung (die Verteilung des Bodensatzes, der meist ziemlich starken Zusammenhang zeigt, wird durch Zerreißen mittels einer Oese oder eines ähnlichen Instrumentes und nachheriges Schütteln erreicht). Nach dem Waschen wird zum Bodensatz soviel Citratlösung hinzugefügt, daß die zum Versuch erforderliche Menge der Aufschwemmung erhalten wird (die Dichtigkeit der Aufschwemmung ist also nicht immer ganz, wohl aber annähernd die gleiche, da bei großen Versuchen mehr Exsudat (von 2 oder 3 Tieren verwendet wurde). Dem Exsudat war oft etwas Blut beigemischt.

III. Das **Blutserum** stammte, wie erwähnt, gleich den Leukocyten vom Meerschweinchen. Es wurde durch Gerinnung aus dem Blute gewonnen, das beim lebenden Tier aus der Carotis in Pipetten aufgefangen worden war. Das Abgießen des Serums vom Gerinnsel — die Gerinnung trat im Verlauf einiger Stunden ein — fand meist 16–20 Stunden nach Entnahme des Blutes und unmittelbar vor dem Versuche statt. (Zentrifugieren selten nötig.)

Die Inaktivierung wurde in der Regel durch halbstündige Einwirkung der Temperatur von 56° erzielt.

Mischung:	Bakterien	2 (seltener 1) Tropfen
	Leukocyten	2 ( „ 1) „
	Serum	2 ( „ 3) „
	Weitere Zusätze	1 ( „ 2) „

Bedingungen der Phagocytose: 30 Minuten Temperatur von etwa 37°.

Die Lösung, die in dieser Arbeit als physiologische Citratlösung bezeichnet ist, hat folgende Zusammensetzung:

Natriumcitrat 1 Proz.,  
Chlornatrium 0,63 Proz.,

d. h. sie hat den osmotischen Druck der gewöhnlichen physiologischen Kochsalzlösung, enthält aber nicht nur Kochsalz, sondern daneben 1 Proz. (der Flüssigkeitsmenge) Natriumcitrat.

Ueber die Gründe, die zur Verwendung dieser Lösung führten, gab ich oben Aufschluß.

Nach diesen grundlegenden kritischen Ausführungen gelangen wir zu den Hauptversuchen.

## I. Hauptteil.

**Untersuchungen über die Phagocytose der Diphtheriebacillen.**

Die Versuche mit Diphtheriebacillen sollten zeigen, ob für Toxine — die bestbekannten der chemischen Bakterienprodukte von pathogener Bedeutung — irgendeine Beziehung zur Phagocytose nachzuweisen ist, desgleichen für Antitoxine, die unter den Antikörpern gleichfalls für die am besten umschriebenen gelten.

Das Toxin wie das Antitoxin verdanke ich Herrn Dr. Krummbein, dem Subdirektor des Berner Instituts zur Erforschung der Infektionskrankheiten. Es sei ihm für die liebenswürdige Unterstützung auch hier bestens gedankt. Es handelt sich um das Toxin, das zur Herstellung des bekannten Berner Heilserums dient. Einfach tödliche Dosis für ein Meerschweinchen von 250 g 0,04 ccm. Das Antitoxin neutralisiert zu  $\frac{1}{200}$  das Toxin (es soll einen Karbolzusatz enthalten; dieser hat sich in den Versuchen, soviel ich sehe, nicht bemerkbar gemacht).

Von Bakterien wurden 10 Stämme verwandt; 6 Stämme zunächst, die nach ihrem morphologischen und kulturellen Verhalten, wie nach ihrer Pathogenität als echte Diphtheriebacillen anzusehen sind (in Einzelheiten natürlich wohl kleinere Abweichungen vom bekannten Typus zeigten); aus einem Stamme ferner (D Mil.), der, bei einem gesunden Menschen, der nur an chronischer Pharyngitis und Rhinitis litt, gelegentlich einer prophylaktischen Untersuchung auf Meningokokken gefunden, morphologisch und kulturell ein echter Diphtheriebacillus, im Tierversuch aber gleich nach der Isolierung in großer Dosis (4 ccm) völlig wirkungslos, später von schwacher (protrahierter) Wirkung war; endlich 2 Stämme, die ich nach dem ganzen Verhalten als typische Pseudodiphtheriestämme bezeichnen muß (Gestalt plump, ziemlich klein, kaum segmentiert; keine Neisserfärbung; Trübung und Alkalinisierung der Bouillon, Mangel jeder pathogenen Wirkung; sehr üppiges Wachstum, mit bräunlicher Farbe, auf Serum. Auf Agar allein trat ein Unterschied der beiden Stämme auf, indem der eine, wie es für Pseudodiphtherie typisch sein soll, sehr üppig wuchs, fast wie auf Serum (nur mehr weiß (D gr.), der andere dagegen in ziemlich zarten Kolonien, fast wie echte Diphtherie (D kl.). Die beiden Stämme stehen in einem merkwürdigen Verhältnis: erstens stammen sie aus derselben Quelle, einem Gehirnabszeß (Entnahme des Materials bei der Operation, also steril!), (der Stamm gr., als der Fall zur Sektion kam, von mir auch aus der bronchopneumonisch affizierten Lunge gezüchtet); es geht aber auch der zartere Stamm in den üppigeren über, denn auf Platten, die nur mit Material des zarten Typus beschickt sind, gehen neben zarten auch spär-

lichere üppige Kolonien auf. Ein weiterer Typus ist D 64: diphtherie-ähnlich (zugespitzter Typus!), aber sehr klein, ohne Neisser und apathogen, sonst (kulturell) wie echte Diphtherie.

Leukocyten und Serum stammten vom Meerschweinchen. Die Versuchsbedingungen sind die auf p. 746 f. geschilderten. Der Plan der einzelnen Versuche ist den Tabellen zu entnehmen.

Das Ergebnis einiger Vorversuche — auf ihre Wiedergabe verzichte ich des beschränkten Raumes halber — war überraschend genug, um den Erreger der Diphtherie und seine apathogenen Verwandten einer eingehenden Prüfung unterziehen zu lassen. Denn seine Deutung führte auf alle Fälle über das hinaus, was über die Antikörper des Diphtheriebacillus bekannt ist. Entweder war

1) das Antitoxin phagocytosebefördernd; dann mußte, wie ich es seit meinen Studien über die Aggressine nicht für ausgeschlossen hielt, das Diphtherietoxin (wie es vom Tetanustoxin behauptet wird) antiphagocytär oder aggressiv wirken; oder es waren

2) im „Antitoxin“ neben dem Antitoxin noch andere Substanzen vorhanden, denen die phagocytosebefördernde Wirkung zugeschrieben werden mußte; dies mußten vermutlich sein:

- a) Opsonin oder Bakteriotropin,
- b) Bakteriolyse, bezw. lytische Ambozeptoren.

Der eine der Vorversuche schien auf die letzte der drei Möglichkeiten hinzuweisen; denn die Förderung der Phagocytose war nur ausgesprochen, wenn das Antitoxin mit aktivem, komplementhaltigem Serum zusammenwirkte.

Die nächsten Versuche wurden alle mit denselben Bakterien ganz nach demselben Schema angestellt; nur die ersten etwas einfacher als die letzten; der letzte ist vor den anderen dadurch ausgezeichnet, daß in ihm doppelte Dosen von Toxin und Antitoxin zugegeben wurden.

Der dritte komplizierteste der Versuche prüft 7 Stämme:

a) in aktivem Serum; 1) ohne anderen Zusatz als den von physiologischer Salzlösung, 2) unter Zusatz von Toxin, 3) unter Zusatz von Antitoxin.



Tabelle III. Hauptversuche mit Diphtheriebacillen.

	D 71	D 62	D 35	D Mil.	D gr.	D kl.	D 64
Versuch V (vom 21. IX. 1907). (Diphtherieversuch A.)							
Physiologische Salzlösung	—	—	—	—	—	—	—
Inaktives Serum	—	—	—	—	—	—	—
Aktives Serum	145 =	0,75 148 =	1,49 168 =	0,80 166 =	0,09 154 =	0,70 156 =	0,23 156 =
Aktives Serum + Toxin	141 =	0,29 146 =	0,25 166 =	0,58 166 =	0,26 166 =	0,46 166 =	0,10 166 =
Aktives Serum + Antitoxin	164 =	1,47 160 =	1,63 166 =	2,16 166 =	1,14 166 =	2,09 166 =	4,28 166 =
Versuch VI (vom 21. IX. 1907). (Diphtherieversuch B.)							
Physiologische Salzlösung	—	—	—	—	—	—	—
Inaktives Serum	—	—	—	—	—	—	—
Aktives Serum	180 =	1,84 180 =	0,71 180 =	1,66 180 =	0,45 180 =	0,63 180 =	1,69 180 =
Aktives Serum + Toxin	116 =	0,64 180 =	0,31 180 =	0,75 180 =	0,27 180 =	0,38 180 =	0,35 180 =
Aktives Serum + Antitoxin	180 =	1,83 180 =	1,08 180 =	2,79 180 =	1,67 180 =	6,89 180 =	6,85 180 =
Versuch VII (vom 29. IX. 1907). (Diphtherieversuch C.)							
Physiologische Salzlösung	—	—	—	—	—	—	—
Physiologische Lösung + Toxin	—	—	—	—	—	—	—
Physiolog. Lösung + Antitoxin	—	—	—	—	—	—	—
Inaktives Serum	—	—	—	—	—	—	—
Inaktives Serum + Toxin	—	—	—	—	—	—	—
Inaktives Serum + Antitoxin	—	—	—	—	—	—	—
Aktives Serum	118 =	0,52 180 =	1,01 180 =	2,31 180 =	0,18 180 =	0,88 180 =	0,54 180 =
Aktives Serum + Toxin	147 =	1,24 180 =	2,28 180 =	2,74 180 =	0,64 180 =	4,07 180 =	1,42 180 =
Aktives Serum + Antitoxin	180 =	5,78 180 =	4,20 180 =	7,34 180 =	4,60 180 =	7,80 180 =	11,47 180 =
Versuch VIII (vom 26. IX. 1907). (Diphtherieversuch D.)							
Physiologische Salzlösung	260 =	> 0,01 260 =	0,14 260 =	0,03 260 =	0,05 260 =	> 0,02 260 =	0,00 260 =
Physiologische Lösung	—	—	—	—	—	—	—
Aktives Serum	148 =	0,60 148 =	0,22 148 =	0,35 148 =	0,55 148 =	0,96 148 =	0,77 148 =
Aktives Serum + Toxin <sup>1)</sup>	180 =	0,11 180 =	0,05 180 =	0,04 180 =	< 0,02 180 =	> 0,02 180 =	0,00 180 =
Aktives Serum + Antitoxin <sup>1)</sup>	180 =	1,56 180 =	0,60 180 =	1,71 180 =	1,21 180 =	1,28 180 =	1,09 180 =

1) Dosis doppelt so groß wie in den Versuchen V, VI, VIII

5 von 7 Stämmen ferner:

- b) in inaktivem Serum, 1) 2) 3) wie unter a;
- c) in reiner Salzlösung, 1) 2) 3) wie unter a.

Das Ergebnis aller dieser Versuche ist graphisch dargestellt in den Kurvenbildern Fig. 2—5, in der Weise, daß alle Indices für ein und denselben Diphtheriestamm in einem bestimmten Maßstab auf eine Vertikale aufgetragen, die Endpunkte entsprechender Indexstrecken der verschiedenen Stämme geradlinig verbunden wurden, ganz wie es in der schon erwähnten graphischen Darstellung geschehen ist (s. p. 740).

Die ausgezogenen Linien entsprechen den Serien a 1, b 1, c 1; die einfach gebrochenen den Serien a 2, b 2, c 2; die punktiert gebrochenen den Serien a 3, b 3, c 3.

Die Betrachtung der vier Kurvenbilder bestätigt zunächst, was wir schon den kritischen Vorbetrachtungen früherer Versuche entnommen haben, daß nämlich bei unserer Art der Indexbestimmung (Auszählen größerer Leukocytenmengen!) die Zuverlässigkeit der Methode eine recht befriedigende ist; die entsprechenden Kurven zeigen in allen vier Versuchen im allgemeinen einen entsprechenden Verlauf.

Bei der dicken einfach gebrochenen Kurve, die wegen der Größe der Werte, die ihr zugrunde liegen, naturgemäß die deutlichsten Ausschläge hat, stellt man durchweg zunächst (bei Stamm II) eine Senkung fest, bei Stamm III eine Hebung, bei Stamm IV wieder eine Senkung, dann in Versuch A—C eine starke Hebung für Stamm V, die sich in Versuch A und C für Stamm VI noch verstärkt, in Versuch B gleichbleibt, endlich für Stamm VII wieder eine beträchtliche Senkung. Auf den Unterschied, den die rechte Hälfte des Kurvenbildes gegenüber den drei anderen zeigt, kommen wir zurück.

Die Uebereinstimmung der verschiedenen Versuche ist um so bemerkenswerter, als zu jedem Versuche ein anderes Serum und andere Leukocyten verwendet worden sind; sie zeigt, daß die Reaktion des Meerschweinchenorganismus im in-vitro-Versuch eine in weitgehendem Maße generelle, vom Individuum unabhängige ist; sie zeigt ferner, was man freilich eher erwarten wird, daß die Diphtheriestämme innerhalb des Zeitraums von fast zwei Wochen bei fast täglicher Umcüchtung die gleiche Art der Reaktion beibehielten.

Nachdem wir uns so der Zuverlässigkeit unserer Ergebnisse vergewissert haben, dürfen wir fragen, was wir für unsere Fragestellung gewonnen haben.

Fig. 2—5. Versuche mit Diphtheriebacillen. (Einfluß des Zusatzes

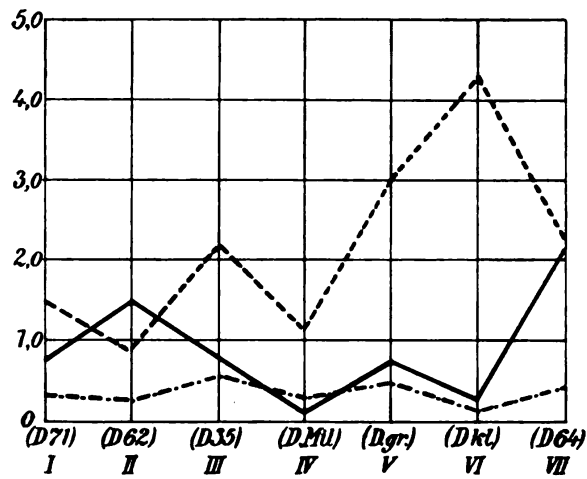


Fig. 2.

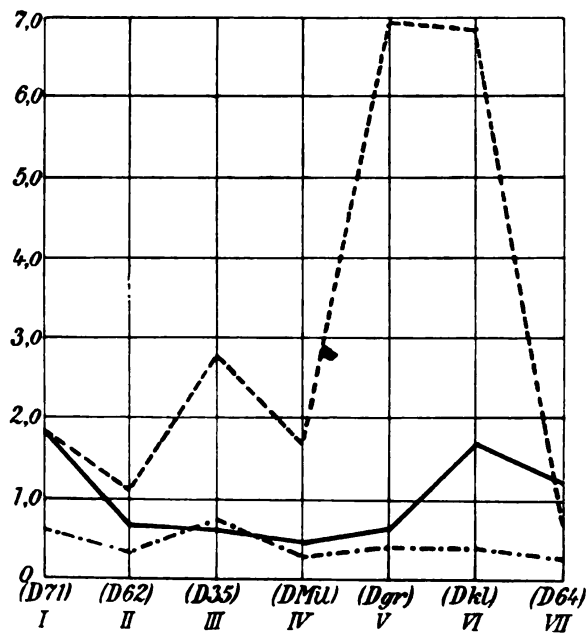


Fig. 3.

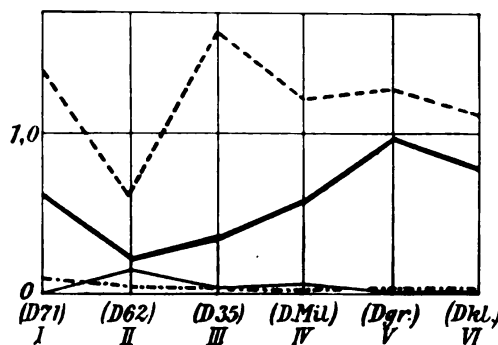


Fig. 5.

(1) — aktives Serum ohne Zusatz (Fig. 2—5)  
 (2) — inaktives " " (nur Fig. 4)  
 (3) — physiol. Lösung " " (nur Fig. 4 u. 5)

Gemeinsame Erklärung für die  
 Figuren 2, 3, 5 und 4 (p. 752 und 753).

von Antitoxin und Toxin [im Versuch der Fig. 5 doppelte Dosen!].)

(4) ----- aktives	Serum mit Antitoxinzusatz (Fig. 2—5)	(7) ----- aktives	Serum mit Toxinzusatz (Fig. 2—5)
(5) ----- inaktives	" "	(8) ----- inaktives	" "
(6) ----- physiol. Lösung	" "	(9) ----- physiol. Lösung	" "

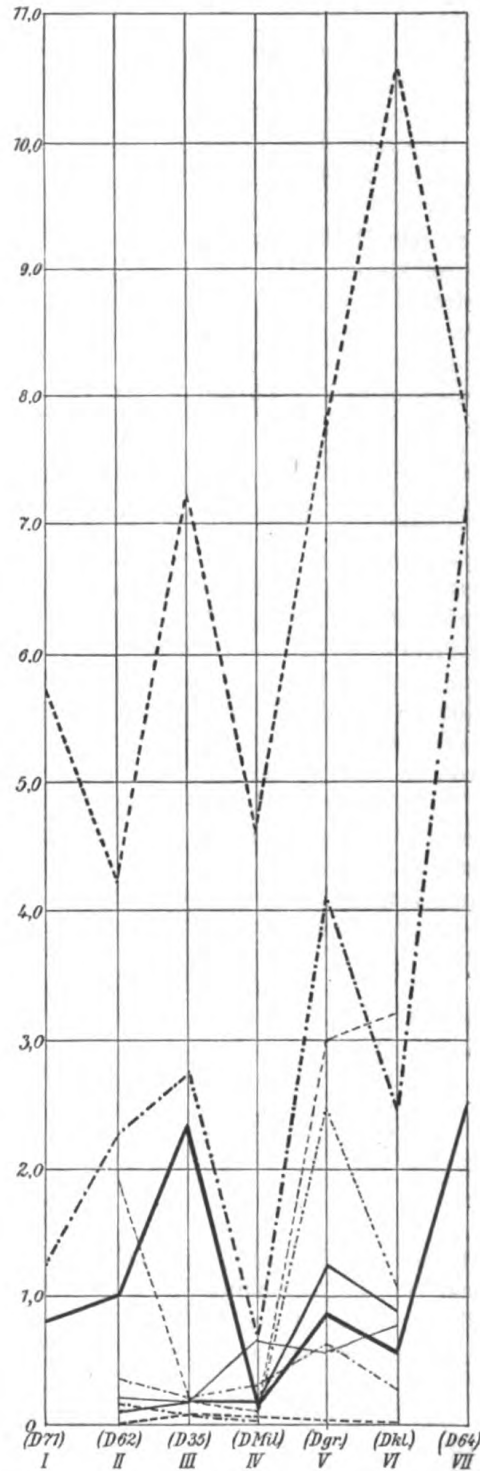


Fig. 4.

51\*

Diese lautete zunächst:

Sind „Toxin“ und „Antitoxin“ von Einfluß auf die Phagocytose?

Fassen wir zunächst nur die Versuchsserien a1, a2, a3 ins Auge, d. h. Versuche, bei denen aktives Serum mit Salzlösung (zur Kontrolle), mit Toxin und mit Antitoxin zusammen verwendet wird, so beantworten unsere Versuche diese Frage mit einem unbedingten „Ja“; soweit es sich um Antitoxinzugabe handelt. Der Index geht bei Zusatz von Antitoxin durchweg — mit einer einzigen Ausnahme — deutlich in die Höhe (die Ausnahme in Versuch A, durch Stamm II gebildet, bei kleinen Werten und geringem Unterschied). Die Antitoxinkurve geht der physiologischen, wie ich mich der Kürze halber ausdrücken möchte, im allgemeinen parallel, doch in keinem Versuche ganz genau (dicke ausgezogene und dicke einfach gebrochene Linie). Der Grund für die Unregelmäßigkeit dürfte bei der ersteren Linie zu suchen sein; ihre Werte sind kleiner als die der zweiten und deshalb weniger zuverlässig; für diese Auffassung spricht die Uebereinstimmung der Kurven der zweiten Art unter sich auf der einen, die nicht ganz unbeträchtlichen gegenseitigen Abweichungen der Kurven der ersten Art auf der anderen Seite.

Der Parallelismus zeigt aber, ganz abgesehen von den kleineren Abweichungen, die wir eben als Unregelmäßigkeiten glaubten charakterisieren zu dürfen, eine Eigentümlichkeit; er ist, könnte man sagen, nur ein quantitativer; wohl gehen den Hebungen Hebungen, den Senkungen Senkungen parallel, aber während in der ersten Hälfte des Kurvenbildes, d. h. für die Stämme I—IV, die gebrochene Kurve der ausgezogenen noch ziemlich nahe ist, entfernt sie sich in der zweiten, insbesondere für Stamm V und VI, von ihr beträchtlich, doch nur in den Versuchen A bis C; im Versuche D nähert sie sich in der zweiten Hälfte der ausgezogenen Kurve vielmehr an. Bemerkenswert ist endlich, daß die absoluten Werte von Versuch A und B sich nicht sehr stark voneinander unterscheiden; daß die vom Versuch C dagegen besonders hoch, die von Versuch D, zumal in der zweiten Hälfte des Versuchs, besonders niedrig sind, so

	in Versuch	A	B	C	D
für Stamm I		1,47	1,83	5,78	1,56
II		1,63	1,08	4,20	0,60
III		2,16	2,79	7,34	1,71
IV		1,14	1,67	4,60	1,21
V		2,99	6,89	7,80	1,28
VI		4,28	6,85	11,47	1,09
VII		2,28	6,73	7,29	—

Berechnen wir, um die Verhältnisse noch mehr übersichtlich zu machen, für die Antitoxinprüfung die relativen Indices, d. h. den Grad der Phagocytose, auf den des Versuches mit reinem Normalserum als Einheit bezogen, so bekommen wir folgende Zahlen:

	Versuch A	Versuch B
	+ At. : 0 At.	+ At. : 0 At.
für Stamm I	1,47 : 0,75 = $\underline{2}$	1,83 : 1,84 = $\underline{1}$
II	1,63 : 1,49 = $\underline{1\frac{1}{6}}$	1,08 : 0,71 = $\underline{1\frac{1}{2}}$
III	2,16 : 0,80 = $\underline{2\frac{3}{4}}$	2,79 : 1,66 = $\underline{1\frac{3}{8}}$
IV	1,14 : 0,09 = $\underline{12\frac{1}{2}}$	1,67 : 0,45 = $< \underline{4}$
V	2,99 : 0,70 = $\underline{4\frac{1}{2}}$	6,89 : 0,63 = $\underline{11}$
VI	4,28 : 0,23 = $\underline{18}$	6,85 : 1,69 = $\underline{4}$
VII	2,28 : 2,13 = $\underline{1\frac{1}{6}}$	0,73 : 1,19 = $< \underline{\frac{1}{2}}$
	Versuch C	Versuch D
	+ At. : 0 At.	+ At. : 0 At.
für Stamm I	5,78 : 0,52 = $\underline{(11)}$	1,56 : 0,60 = $\underline{2\frac{3}{5}}$
II	4,20 : 1,01 = $\underline{4\frac{1}{5}}$	0,60 : 0,22 = $\underline{2\frac{3}{5}}$
III	7,34 : 2,31 = $\underline{3\frac{1}{2}}$	1,71 : 0,35 = $\underline{5}$
IV	4,60 : 0,18 = ca. $\underline{25}$	1,21 : 0,55 = $< \underline{2\frac{1}{2}}$
V	7,80 : 0,88 = ca. $\underline{9}$	1,28 : 0,96 = $\underline{1\frac{1}{3}}$
VI	11,47 : 0,54 = $\underline{21}$	1,09 : 0,77 = $\underline{1\frac{1}{2}}$
VII	7,29 : 2,52 = $< \underline{3}$	1,56

oder, in graphischer Darstellung, das Kurvenbild Fig. 6.

Erinnern wir uns nun dessen, was über die Eigentümlichkeit der verschiedenen Stämme oben gemeldet wurde, so können wir sagen:

Virulente, wie avirulente Stämme echter Diphtheriebacillen, sowie typische Pseudodiphtheriebacillen wurden in aktivem normalen Serum phagocytiert, die einen Stämme mehr, die anderen weniger, doch ohne daß irgendeine einfache Beziehung zwischen dem Grad der Virulenz und dem der Phagocytose zu erkennen ist.

Zusatz von Antitoxin hat beträchtliche Steigerung der Phagocytose zur Folge, für echte Stämme im allgemeinen eine schwächere, und zwar für die virulenten eine besonders schwache, für Pseudostämme im allgemeinen eine stärkere.

Die Trennungslinie läuft nicht zwischen echten und Pseudodiphtheriestämmen, sondern zwischen echten virulenten einerseits, echten und unechten avirulenten andererseits hindurch; doch steht es so, daß innerhalb der

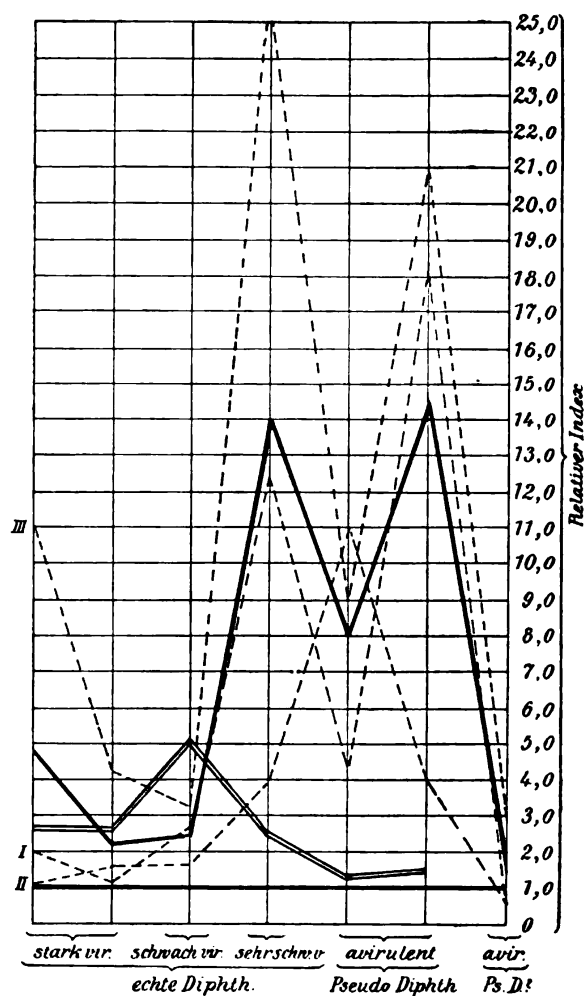


Fig. 6. Dieselben Versuche mit Diphtheriebacillen wie in Fig. 2—5 unter Berechnung der relativen Indices.

----- { „Antitoxinkurven“ der Fig. 2—4 auf die „aktiven Serum-Kurven“ als 1 berechnet (I—III).

===== { „Antitoxinkurve“ der Fig. 5 (doppelte Dosis) auf die „aktive Serum-Kurven“ als 1 berechnet.

———— Durchschnitt der Kurven I—III.

ersten Gruppe kein strenger Parallelismus zwischen Virulenz und Widerstand gegenüber der Phagocytose zu bemerken ist — indem letzterer beim stark virulenten Stamm I geringer ist als beim schwach virulenten Stamm III — daß ferner in der zweiten Gruppe die vorhandenen Unterschiede der Phagocytierbarkeit nicht den systematischen Unterschieden entsprechen, indem der (fast) avirulente echte Stamm gleichstark wie der eine und noch stärker als der andere der unechten (ganz avirulenten) Stämme phagocytiert wird. Keine sichere Wirkung hat der Antitoxinzusatz gegenüber Stamm VII, der sich schon morphologisch stark vom Typus des Diphtherie- und Pseudodiphtheriebacillus unterscheidet.

Weniger deutlich als die phagocytosefördernde Wirkung des Antitoxins ist die phagocytosehemmende des Toxins; sie ist vorhanden in den Versuchen A, B und D; sie besteht in Versuch D, mit der doppelten Dosis, für alle Stämme (Stamm VII fehlt in diesem Versuch); in Versuch A fehlt sie nur für 1 von 7 Stämmen. Die Hemmung ist, absolut genommen, eine ziemlich gleichmäßige, d. h. die Kurve läuft der O-Linie ziemlich parallel; sie liegt ihr sehr nahe in Versuch D, wo die doppelte Toxindosis verwendet wurde; sie ist auch, in Versuch A und B, für Stamm D ausgesprochen, dem gegenüber das Antitoxin ohne Einfluß war.

Eine Ausnahme macht Versuch C; in ihm steht die Toxinkurve durchweg höher — und zum Teil nicht unbeträchtlich höher — als die Kurve für reines Serum. Eine zuverlässige Erklärung hierfür weiß ich nicht zu geben. Ein Unterschied besteht freilich zwischen dem 3. Versuch und den übrigen; er war komplizierter, dauerte — insbesondere die Vorbereitungen — länger; es waren so die Bakterien länger mit der Zusatzflüssigkeit in Kontakt, bevor die Leukocyten zugesetzt wurden, als sonst; ob auf diese Weise das Toxin durch das Serum oder sonstwie eine Abschwächung erfuhr? Man könnte vielleicht auch daran denken, daß in den Röhren mit reinem Serum die Bakterien Zeit gehabt hätten, wirksameres Toxin abzuscheiden, dann mußten sich aber toxische und atoxische Stämme entgegengesetzt verhalten. Diese auffallende Unregelmäßigkeit aufzuklären war ein weiterer Versuch bestimmt; er ist leider, wie mehrere andere Kontrollversuche, mißglückt.

Daß das Diphtherietoxin die Phagocytose eines echten Diphtheriebacillus herabsetzt, könnte man sich so erklären, daß durch die Toxinzugabe das Moment verstärkt wird, dem



der Bacillus seinen normalen (relativen) Widerstand gegenüber der Phagocytose verdankt, vorausgesetzt, daß tatsächlich zutrifft, was Metschnikoff mit Bestimmtheit für den Tetanusbacillus, ich selbst (in meiner Aggressinstudie) vermutungsweise für toxische (ektotoxische) Bakterien überhaupt angenommen habe, daß nämlich das Toxin die einzige aggressive Waffe ist. Dabei kann man aber entweder an einen, für den Leukocyten vielleicht ganz indifferenten, spezifischen chemischen Vorgang denken, der wohl am besten als Absättigung zu bezeichnen wäre; oder aber an eine allgemein wirksame Schädigung der Leukocyten. Ich möchte — zum mindesten neben dem ersteren Vorgang — an den letzteren denken, da das Toxin auch für atoxische, sogar Pseudostämme, ja für den sicher nur sehr entfernt verwandten und ganz atoxischen Stamm VII sich wirksam zeigte.

Da das freie Toxin also, wie wir erwartet haben, der Phagocytose entgegenwirkt, ist die Annahme, daß das toxische Bakterium sich eben durch das Toxin der Phagocytose erwehrt, nicht unbegründet. Die Annahme ist aber doch nicht streng erwiesen, solange wir nicht wissen, ob in der Flüssigkeit, die wir „Toxin“ nennen, von Substanzen, die für die Phagocyten von Bedeutung sein können, nur Toxin enthalten ist.

Wüßten wir von solchen hypothetischen Körpern (wie Aggressinen, Antiopsoninen usw.) irgend etwas Bestimmtes, was sie vom Toxin in einer Mischung mit Toxin unterscheiden ließe, so wäre die Entscheidung einfach. Auf einem Umweg könnte sie dadurch herbeigeführt werden, daß man verschiedene „Toxine“ — ich meine natürlich hier verschiedene „Proben“ ein und desselben Toxins aus verschiedenen Quellen stammend — auf den Parallelismus von toxischer und phagocytosehemmender Wirkung untersuchte.

Ich habe einen anderen Weg eingeschlagen, indem ich wiederum vom Antitoxin ausging. Es ist klar: wenn im „Toxin“ verschiedene Körper der hypothetischen Art (d. h. aus der Gruppe der Substanzen, die man als Antigene zusammenfaßt) vorhanden sind, so müssen auch durch Behandlung eines Tieres mit diesem „Toxin“, also bei der „Antitoxin“-Bereitung, verschiedene Antikörper entstehen, z. B.

vielleicht, neben chemisch reinem Antitoxin, noch Antiaggressine, Opsonine, Bakteriotropine, möglicherweise auch lytische Antikörper usw. Was letztere betrifft, so hat man bekanntlich geglaubt, daß gegen den Diphtheriebacillus keine solchen zu erhalten sind, bis es, dank besonderen Maßregeln, Wassermann gelang, sie zu erzeugen. Diese Antikörper bieten aber gegenüber den Antigenen ganz allgemein den Vorteil leichter nachzuweisender Unterschiede; der verschiedene Grad der Thermolabilität, wie auch leicht zu erkennende Verschiedenheiten der Struktur (einfacher oder zusammengesetzter Bau) geben brauchbare Anhaltspunkte.

Wir haben bis jetzt, was das Antitoxin betrifft, nur das eine festgestellt, daß das sogenannte Antitoxin die Phagocytose in normalem Serum erhöht.

Soll diese Wirkung einem reinen „Antitoxin“ im chemischen Sinne zugeschrieben werden können, so müßte sie nur gegenüber toxischen Stämmen zu beobachten sein. Denn, bringen wir atoxische Stämme mit den Leukocyten zusammen, so gibt es nichts, was das reine Antitoxin zu neutralisieren hätte. Wie wir sehen, ist aber gerade das Umgekehrte der Fall: atoxische Stämme werden vom „Antitoxin“ besonders stark geschützt.

Es muß also in unserem „Antitoxin“ außer wirklichem Antitoxin noch ein anderer Antikörper vorhanden sein, der die Phagocytose von Bacillen der Gruppe des echten und des Pseudodiphtheriebacillus erleichtert.

An „Opsonin“ war kaum zu denken, da es sich um altes Serum handelte. Es blieben von bekannten Substanzen die Bakteriotropine und die Lysine. Eine Differenzierung war nicht so einfach, wie die zwischen Lysin (von dem in dem alten Serum natürlich nur der Ambozeptor in Betracht kommen konnte) und Opsonin — für welche Erwärmung auf die übliche Inaktivierungstemperatur genügte —; doch war sie auch nicht sehr schwierig.

Wirkte nämlich das „Antitoxin“ durch ein Bakteriotropin phagocytosefördernd, so mußte es auch in inaktivem Serum oder physiologischer Salzlösung wirken; wirkte es aber dank einem lytischen Ambozeptor, so konnte die Wirkung nur in

aktivem Serum — bei Ergänzung durch Komplement — zustande kommen.

Wie der bisher unberücksichtigte Teil des Versuchs III zeigt, war letzteres der Fall.

Das Diphtherie-„Antitoxin“ wirkt nur in Verbindung mit aktivem Serum phagocytosefördernd (und zwar natürlich viel stärker als aktives Serum allein).

(NB. Auch in diesem Teil des Versuches, der sich mit der Phagocytose in aktivem Serum und in physiologischer Lösung beschäftigt, traten einige Unregelmäßigkeiten zutage; da sie mir jeder einheitlichen Erklärung zu spotten scheinen, müssen sie unberücksichtigt bleiben.)

Es darf also wohl angenommen werden:

- 1) daß unser Antitoxin Bakteriolyse (als Ambozeptor) enthält;
- 2) daß das Bakteriolyse es ist, dem man die phagocytosesteigernde Wirkung des „Antitoxins“ verdankt.

Dieses Ergebnis bestätigt nun tatsächlich einige der Vermutungen, mit denen wir an unsere Versuche gegangen sind,

die Vermutung erstens, daß die organischen Flüssigkeiten an Komplikation der Zusammensetzung nachweisbar die Voraussetzungen übertreffen, unter denen sie bisher so oft in „grundlegenden“ Arbeiten — eigentlich entgegen sehr naheliegenden Bedenken — verwendet worden sind;

die Vermutung zweitens, daß auch die bekannten, oder doch im Vergleich mit anderen wohlcharakterisierten Komponenten solcher Flüssigkeiten eine größere Komplikation der Wirkung zeigen, als meist angenommen wird, daß z. B. die Wirkung der Phagocytoseförderung, für die man vor kurzem neue Stoffe als Träger erfunden hat — die Opsonine und Bakteriotropine — auch durch die alten Bakteriolyse zu erreichen ist. (Ob aller Phagocytoseförderung Lysine zugrunde liegen, wird damit natürlich nicht entschieden.)

Von der Erkenntnis, daß in unseren Versuchen Bakteriolyse tätig sind, fällt auch Licht auf die Tatsache, die

sonst unverständlich bliebe, daß nämlich eine Erhöhung des Antitoxinzusatzes eine Herabsetzung des Index zur Folge hat. Die Hauptwirkung der Lysine ist ja, wie der Name besagt, die Lösung; die Lösung wächst mit der Menge des Lysins. Die Diphtheriebacillen gehören zweifelsohne zu den schwer aufzulösenden Bakterien (manche Forscher rechnen sie noch zu den unlösbaren). (Dies ist wohl wesentlich mit daran schuld, daß man an der Existenz von Diphtherielysin so lange gezweifelt hat.) Auch ich habe in meinen Versuchen A—C von Lyse nichts bemerkt; im Versuch D fiel mir aber sofort die Spärlichkeit der Bacillen auf; in diesem Versuch erst ist also wohl die Menge des Antikörpers so groß gewesen, daß auch die lytische Wirkung zum Ausdruck kam, während sie in allen anderen Versuchen nur eben genügte, den Phagocyten ihr Werk zu erleichtern. Es entspricht dies wiederum einer unserer Erwartungen, daß nämlich die Ermöglichung der Phagocytose, als eine Art Vorverdauung, die Einleitung des Prozesses sei, der im günstigen Falle in der Lyse endigt.

Daß bei der Phagocytose auf Seite des Bakteriums nur dieser Prozeß der Vorverdauung wirksam sei, behaupte ich damit keineswegs; es kommt nach meinem Dafürhalten außer diesem (wenn man will, negativen) Prozeß — in manchen Fällen wenigstens — wohl noch ein positiver dazu: die Absonderung positiv chemotaktischer Substanzen.

Und daß, nach meiner Ansicht, unter natürlichen Verhältnissen der Phagocytose viel kompliziertere Prozesse, als es diese Chemismen sind, entgegenarbeiten, habe ich in meiner wiederholt zitierten Studie (p. 1002 ff.) ausführlich dargelegt.

## II. Hauptteil.

### Versuche mit Streptokokken.

Hatten die Diphtherieversuche ein „antitoxisches“ Serum auf sein Verhältnis zur Phagocytose geprüft, so sollte durch die Versuche mit Streptokokken der Einfluß eines teils für bakteriotrop, teils für „lytisch“ gehaltenen Serums auf die Phagocytose klargelegt werden.

Um den Zusammenhang der „Bakteriotropine“ — derjenigen Klasse von phagocytosebefördernden Substanzen, die allein beständig (außerhalb des Körpers haltbar!) ist, somit auch allein für mich, der ich mit einem käuflichen Heilserum arbeiten wollte, in Betracht kam — mit den lytischen Antikörpern festzustellen, schien mir eine Untersuchung gerade an Streptokokken besonders aussichtsreich. Gerade im Streptokokkenimmenserum haben ja Neufeld und Rimpau die „Bakteriotropine“ entdeckt, gegen Streptokokken sollen aber auch lytische Antikörper gebildet werden, wenn sie schon nicht so leicht wie bei anderen Bakterien zur Lyse führen. Daß eine Auflösung möglich ist und unter Umständen in recht ausgedehntem Maße vorkommt, dürften die Vergiftungserscheinungen beweisen, die von einem Infektionsherd nach Lösung der Stauungsbinde ausgelöst werden oder in schweren Fällen von Allgemeininfektion, wo der Körper viele Bakterien enthält, nach Injektion von „Schutzserum“ beobachtet worden sind. Daß die Lösung nicht leicht eintritt, zeigt tägliche Erfahrung des Experimentators. Gerade der letztere Umstand ist es, der das Bakterium für unsere Versuche besonders geeignet macht. — Bevor ich zu den beiden großen Versuchen übergehe, die zur Lösung dieser Hauptfrage mit Erfolg unternommen wurden, sei einigen Versuchen Raum gegönnt, die über die Streptokokkenphagocytose ganz im allgemeinen orientieren sollten.

#### Vorversuche.

Den oben erörterten Prinzipien gemäß habe ich mich auch bei den Versuchen mit Streptokokken nicht auf einen einzigen Stamm beschränkt.

Die ebenso erfolglosen als eifrigen Klassifikationsversuche, die dem Streptococcus seit Jahren, ja Jahrzehnten gewidmet werden, beweisen zur Genüge, wie wenig von einem typischen Streptococcus geredet werden kann, wie wenig allgemeine Bedeutung einer Untersuchung zukommen kann, die sich auf die enge Basis einer monographischen Studie stützen wollte.

Schon einige kleine Versuche überzeugten mich, daß verschiedene Streptokokkenstämme, wie gegenüber anderen Methoden, so auch im Phagocytoseversuch sich sehr verschieden verhalten können.

Es zeigte sich dabei eine Schwierigkeit, die das Arbeiten mit Streptokokken ganz im allgemeinen erschwert.

Auf festen Nährböden, die sich ja zur Gewinnung des Bakterienmaterials am meisten empfehlen, wachsen die Streptokokken nicht nur sehr wenig, sondern auch sehr verschieden üppig, was sich, wenn man die Stämme nicht alle ganz genau kennt, bei größeren Versuchen, wo man reichlichen Materialbedarf, störend bemerkbar machen kann: die Beläge sind ferner und vor allem auch in ihrer Kohärenz außerordentlich verschieden; manche ergeben ohne große Schwierigkeit eine gleichmäßig milchige Aufschwemmung, andere trotz aller Bemühungen nur mehr oder weniger feine Bröckel. Daß sich der Unterschied im Phagocytoseversuch bemerkbar machen muß, ist klar. Ich bin später von der Anwendung fester Nährböden abgekommen und zu der von Bouillonkulturen übergegangen. Diese geben erstens eher reichlicheres Material, zweitens ist das Material leichter zur brauchbaren Aufschwemmung zu verarbeiten. Um die Kulturflüssigkeit auszuschalten, die nicht als indifferent betrachtet werden kann, wurden die Bakterien wie die Leukocyten aus dem Exsudate ausgeschleudert und gewaschen. So wurden die Bakterien für den unten mitgeteilten großen Versuch gewonnen; die Waschung war hier nur eine einmalige in der Voraussicht, daß die Bakterien leichter als Leukocyten von der anhaftenden Flüssigkeit zu befreien sind, in der Voraussicht auch, daß mögliche Flüssigkeitsreste aus der Kultur nicht von so großer Bedeutung wie Reste von Exsudat sein würden, zumal sie im ganzen Versuche gleichmäßig wirken mußten.

Sehr schön tritt ein wichtiger qualitativer Unterschied in der Phagocytose zweier Streptokokkenarten im folgenden Versuch zutage.

Tabelle IV.

Versuch IX.

Mit Streptokokken (vom 30. IV. 1907).

Phagocytierendes Material gewaschene Meerschweinchen- leukocyten.	Streptokokken 61		Streptokokken 62	
	Leukocyt. I	Leukocyt. II	Leukocyt. I	Leukocyt. II
Inaktives Serum	$\frac{180}{80} = 3,53$	$\frac{180}{80} = 2,38$	$\frac{180}{80} = 0,85$	$\frac{118}{80} = 1,27$
Aktives Serum	$\frac{180}{80} = 2,35$	$\frac{118}{80} = 2,54$	$\frac{520}{80} = 6,61$	$\frac{118}{80} = 6,64$

Wir lernen durch diesen Versuch zwei Typen von Streptokokken kennen, einen, der sich wie die meisten anderen Bakterien, insbesondere die oben schon genauer studierten (Staphylokokken, Typusbacillen, Choleravibrionen, Milzbrandbacillen) verhält, d. h. nur vom aktiven Serum zur

Fig. 7 und 8. Streptokokkenversuche A und B (Tabelle p. 766, Text

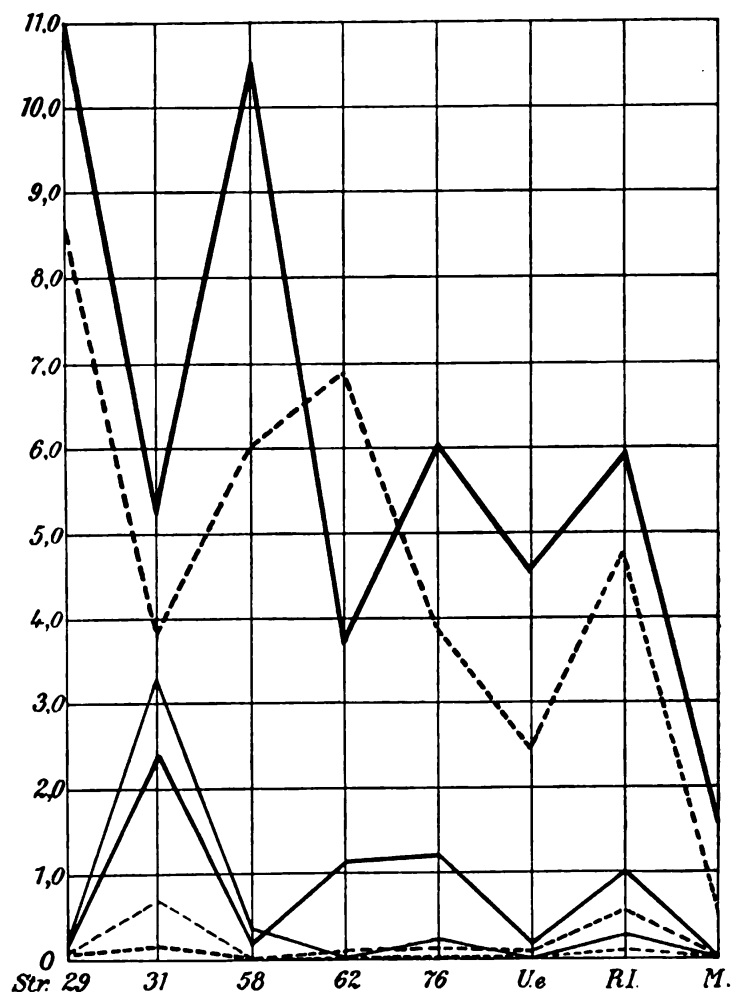


Fig. 7.

Phagocytose gebracht wird, und einen zweiten, der sich im aktiven Serum nicht anders als im inaktivierten verhält, und zwar in beiden phagocytabel ist, der also in die atypische Gruppe 4 des Wrightschen Systems gehören würde, zu der nach Wright — meinen Erfahrungen zufolge mit Unrecht — bisher nur die Diphtheriegruppe gehörte.

Leider hat mich starke berufliche Inanspruchnahme den atypischen Streptokokkenstamm verlieren lassen, bevor eine genaue Untersuchung hatte stattfinden können.

p. 765 ff.): Wirkung von Merckschem Antistreptokokkenserum.

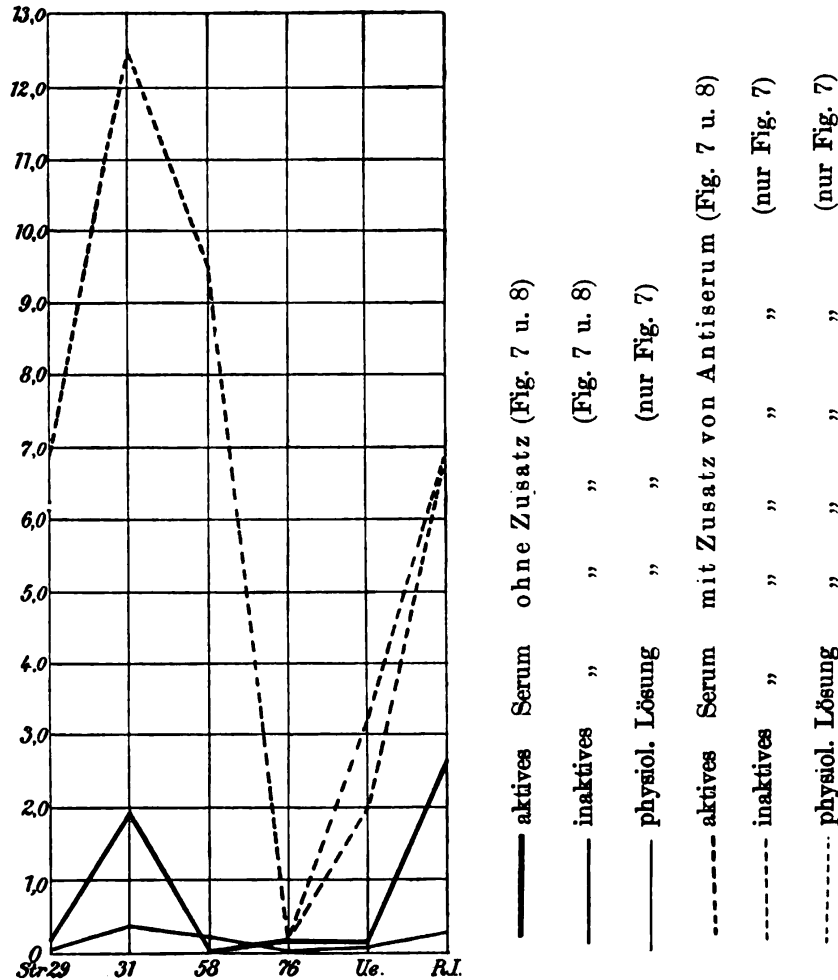


Fig. 8.

Die **Hauptversuche** hatten folgenden Versuchsplan:

Erstens sollte auf möglichst breiter Basis das Verhalten im Phagocytoseversuch bei Verwendung von normalem Serum festgestellt werden; zweitens das bei Zugabe von Immunsérum; diese Zugabe sollte erfolgen wie im lytischen Versuch: einestheils isoliert, dann im Verein mit Zusatz von frischem aktiven Serum.

Ueber den tatsächlichen Verlauf der Versuche berichtet die nachstehende Tabelle V sowie Fig. 7 und 8. Bei den folgenden Erörterungen



## Versuch X.

(vom 25. IX. 1907).

## Versuch XI.

(vom 29. IX. 1907).

Digitized by Google

bediene man sich der graphischen Darstellung, die die Beherrschung der Tatsachen sehr erleichtert; ihre Erklärung entspricht im allgemeinen der oben — für die Diphtherieversuche — gegebenen. Sondererklärung für beide Figuren neben Fig. 8 auf p. 765.

Als Bakterien dienten acht Streptokokkenstämme, von denen fünf aus dem Halse Angina- oder Diphtheriekranker stammten (Str. 29, 31, 58, 62, 76), einer aus einer Phlegmone (Str. R.), einer, durch längliche Form der Einzelglieder und außerordentlich lange Ketten ausgezeichneter, aus einem Fall von puerperaler Sepsis (Str. U. e.), einer endlich aus einem sonst sterilen stark sauren Harn ohne Eiter (Bakteriurie?) bei unklarer Krankheit (Str. 111).

Das Normalserum (ebenso natürlich die Leukocyten) wurde dem Meer-schweinchen entnommen.

Das Immunserum verdanke ich der Liebenswürdigkeit der Firma Merck in Darmstadt. Es schien mir angezeigt, ein Serum zu benutzen, das auch praktisch von Bedeutung ist, um so mehr, als es sich im Merckschen um ein polyvalentes Serum handelt.

Die beiden Hauptversuche verlangen gesonderte Besprechung, da ihr Ergebnis ein auf den ersten Blick ganz verschiedenes, ja entgegengesetztes ist.

### Versuch A.

In einer Salzlösung, in inaktivem und aktivem Normalserum verläuft die Phagocytose im allgemeinen dem Wrightschen Gesetz gemäß.

Es hat also eine stärkere Phagocytose nur in aktivem Serum statt; in reiner Salzlösung ist sie, mit einer Ausnahme, fast null; in inaktivem Serum in der Hälfte der Fälle gleichfalls beinahe null, in der anderen Hälfte nicht ganz unbedeutend, immerhin bedeutend (3—6mal) kleiner als im aktiven Serum; ausgenommen wiederum einen Fall, und zwar denselben Fall, der auch in der Salzreihe die Ausnahme macht. Es ist Stamm 31, bei dem die Indices für Salzlösung und inaktives Serum sich dem für aktives Serum bis auf etwa die Hälfte nähern, wo also, wie bei Stamm 61, den wir oben kennen lernten, die Spontanphagocytose eine besonders starke ist.

Fassen wir die Indices für aktives Serum näher ins Auge, so stellen wir große Unterschiede fest. Diese Unterschiede dürften erheblich größer sein, als wir nach der äußeren Ungleichheit der Einzelversuche, wie sie in der bald größeren, bald geringeren Dichtigkeit und Homogenität der Bakterienaufschwemmungen gegeben sind, erwarten müßten. Da jedoch ein sicherer Maßstab für diese äußere Ungleichheit fehlt, wird es besser sein, die graduellen Unterschiede der Indices verschiedener Stämme außer acht zu lassen.

Im zweiten Teil des Versuches, der den Einfluß des Immunserums zeigt, fällt sofort zweierlei auf:

1) Die Kurve der Hauptindices, derer nämlich für aktives Serum + Immunserum, geht der Hauptkurve des ersten Versuchsteils in schönster Weise parallel; nur an einem Punkt, bei Stamm 62, überschneiden sich die Kurven stark. Auch die Nebenkurven zeigen, soweit sie überhaupt über der Null-Linie liegen, diesen Parallelismus;

2) alle 3 Kurven des zweiten Versuchsteiles liegen tiefer als die entsprechenden des ersten.

Was bedeutet dies?

Zunächst sicher das eine, daß unser Immunserum nicht den Angaben von Neufeld-Rimpau entspricht, also als einzig wirksamen Faktor Bakteriotropine enthält, denn sonst hätten alle 3 Kurven des zweiten Teils höher liegen müssen.

Die Wrightschen Opsonine sind für unser Immunserum als unbeständig ohne weiteres auszuschließen.

Als der nächstliegende Schluß mag der erscheinen, daß in dem verwendeten Immunserum überhaupt keine Schutzstoffe vorhanden waren.

Diese Annahme läßt aber zunächst die Tatsache außer acht, daß die Indices für Immunserum nicht gleich wie die andern, sondern kleiner sind (daß es sich hier nicht um Differenzen handelt, die innerhalb der Fehlergrenzen liegen, ist nach dem früher Gesagten klar, ergibt sich auch aus dem schönen Parallelgehen der Kurven). Es rechnet die bewußte Annahme aber vor allem nicht mit einer Tatsache, die in dem Kurvenbilde freilich nicht zum Ausdruck kommt, die die Präparate aber in ganz aufdringlicher Weise verraten, nämlich mit einer sehr starken Verminderung der Bakterien in allen Fällen, wo das Immunserum im Spiele war.

Es kann demnach das Immunserum keineswegs indifferent gewesen sein. Enthielt es Bakteriolyse? Man wird dies nicht annehmen wollen, da die Verminderung der Bakterienzahl auch in der Salzlösung und im inaktiven Serum eingetreten war, wo doch das Komplement fehlte, das erst den Ambozeptor des Immunserums hätte wirksam machen können. Man darf aber nicht vergessen, daß überall außer dem Immun-

serum Leukocyten vorhanden waren, die ja noch von vielen Autoren für Komplementbildner gehalten wurden. Uebrigens war die Wirkung des Immunserums auch in den Röhrchen mit aktivem Serum viel stärker (hier war auch die Leukocytenzahl stark herabgesetzt); man könnte dies, nach den Erfahrungen von Diphtherieversuch D, so erklären, daß die durch Bakteriolyse frei gewordenen Gifte die Leukocyten zum Teil getötet hätten; an den vorhandenen Leukocyten waren Zeichen der Schädigung nur hin und wieder, d. h. in dem einen oder anderen Präparate zu sehen.

Man könnte freilich noch an etwas anderes denken, nämlich an Agglutination; diese mochte aus der Flüssigkeit den größeren Teil der Bakterien — und mit ihnen vielleicht auch der Zellen — ausgefällt haben. Das Agglutinin bedürfte des Komplementes nicht; es wäre also die Verminderung der Bakterienzahl auch in den Röhrchen mit inaktivem Serum oder Salzlösung ohne Hilfshypothese verständlich.

Wenn ich mich nicht für diese zweite Annahme entschieße, so geschieht es

- 1) weil von der Agglutination nichts nachzuweisen war,
- 2) weil Anzeichen von Bakteriolyse in einigen Präparaten mikroskopisch deutlich zu sehen waren,
- 3) weil bei Annahme einer rein agglutinierenden Wirkung der Sera, die stark genug wäre, die starke Veränderung der Bakterienmenge zu erklären, die immerhin relativ starke Phagocytose in den Röhrchen mit aktivem Serum + Immunserum schwer zu verstehen wäre (wir haben oben gesehen, wie stark die Phagocytose je nach der Bakterienmenge schwankt).

Was feststeht ist

- 1) eine starke Verminderung der Bakterien (und Zellenmenge) in allen Röhrchen mit Immunserum, vorzüglich in denen mit Zusatz von aktivem Serum,
- 2) in den Röhrchen mit Immunserum eine Phagocytose gleich der in den entsprechenden Röhrchen ohne Immunserum, nur um ein wenig schwächer ausgesprochen.

Mit Sicherheit zu erschließen ist also aus diesem ersten Versuche nur, daß das Mercksche Antiserum nicht Neufeld-Rimpasches Bakteriotropin allein

enthält, sondern daß diese Substanzen höchstens neben einer anderen vorhanden sind, die die Wirkung der phagocytosefördernden Stoffe durch Verminderung der Bakterienmenge zu verdecken geeignet ist: Agglutinin oder Bakteriolyse. Die Tatsachen sind im vorliegenden Versuche nicht eindeutig genug, um einem die Entscheidung für die eine oder andere der letzteren Substanzen zu gestatten.

Der Versuch A entspricht, wie man sieht, dem Diphtherieversuch D, mit starkem Antitoxinzusatz, wo voraussichtlich ebenfalls dank Bakteriolyse statt der üblichen Steigerung der Phagocytose eine Verminderung zur Beobachtung kam.

### Versuch B.

Ganz anders, nämlich analog den Diphtherieversuchen A—C, verlief ein zweiter Versuch, der nach demselben Plane, wie der vorige, nur leider (aus äußeren Gründen) in vereinfachter Form ausgeführt wurde.

Stämme: 6 von den 8 des vorigen Versuches.

- Serien 3: I. mit inaktivem Serum allein,  
 II. mit aktivem Serum allein,  
 III. mit aktivem Serum + Immunserum.

In Serie I Phagocytose durchweg fast null; nur bei 31 eine leichte Erhebung, die der stärkeren im vorigen Versuche entspricht; bei R I eine zweite, noch schwächere, die im vorigen Versuch gleichfalls als Erhebung zweiter Ordnung zum Ausdruck kam.

In Serie II Phagocytose für die ersten beiden und den letzten Stamm beträchtlich stärker, dem Wrightschen Gesetz gemäß, für die übrigen 3 Stämme aber fast null. Es weicht hier der Versuch deutlich vom vorigen ab (wo aktives Serum durchweg einen beträchtlichen Index erzeugte), ohne daß ich imstande wäre, den Grund der Differenz anzugeben; denkbar sind solche Gründe schon (vor allem könnten Unterschiede der Bakterienmenge in Betracht kommen; die Tatsachen geben aber zu wenig Anhaltspunkte, sich für den einen oder anderen zu entscheiden).

In Serie III tritt nun der Hauptunterschied gegenüber Versuch A hervor:

Außer für einen Stamm (76) wird hier eine sehr erhebliche Steigerung der Phagocytose durch Zusatz von Immunserum offenbar:

	von 0,33	auf 6,83		für Stamm 29
	" 1,19	" 12,47		" " 31
	" 0,00	" 9,58		" " 58
nur	" 0,08	" 0,19		" " 76
	" 0,08	" 2,01 bzw. 3,24		" " U. e.
	" 2,65	" 6,90		" " R. I

Dieser Versuch würde also die Annahme stützen, daß in unserem Immunserum tatsächlich ein phagocytosefördernder Faktor vorhanden ist, trotzdem ein solcher im vorigen Versuche nicht zur Geltung kam; der vorige Versuch aber zwingt uns, wie mir scheint, nach wie vor, in diesem Serum noch einen zweiten Faktor anzunehmen, der, unter gewissen Umständen, die Wirkung des ersten hindert.

Welches sind nun diese beiden Faktoren, und welches die Umstände, die bald den einen, bald den anderen hervortreten lassen?

Ueber den ersten Punkt kann ich leider nicht Auskunft geben. Wie gesagt (und aus Tafel und Tabelle ersichtlich) war der zweite Versuch aus äußeren Gründen vereinfacht worden: es fehlt in ihm vor allem die Serie mit Immunserum + inaktiviertem Serum. Dies macht es natürlich unmöglich, zu entscheiden, welcher Art der Faktor ist, dem wir die Phagocytosesteigerung im Immunserum verdanken. Den vorliegenden Tatsachen nach kann es von den beiden Substanzen, die nach dem oben Gesagten in Betracht kämen — Bakteriotropin und Bakteriolyisin —, sowohl die eine, wie die andere sein; erst die Serie mit inaktivem Serum + Immunserum hätte durch ihr positives oder negatives Ergebnis die Entscheidung zugunsten der ersten oder der zweiten Substanz gebracht.

Was den zweiten Punkt betrifft — d. h. die Bedingungen, die bald den einen, phagocytosefördernden, bald den andern phagocytosehemmenden, Faktor hervortreten läßt, kann ich nur eine Vermutung äußern, die nämlich, daß die Hauptbedingung in der Dosis liegt, wie es für die Diphtherieversuche nachgewiesen ist. Leider habe ich versäumt, mir für die Streptokokkenversuche die verwendete Dosis von Antiserum zu notieren. Daß sie im letzten Versuch 1 Tropfen betrug, dessen glaube ich mich bestimmt zu erinnern. Daß sie im ersten Versuche doppelt so groß war, ist möglich, mir aber nicht mit derselben Gewißheit erinnerlich.

Wie erwähnt, habe ich mehrere weitere Versuche unternommen, um die Lücke auszufüllen, doch infolge widriger Zufälle ohne ein brauchbares Ergebnis zu erzielen. Außere Umstände machten es mir unmöglich, eine entscheidende Ant-

wort durch weitere Wiederholungen zu erzwingen. Ich veröffentliche diese Ergebnisse somit nicht als These, sondern als Programm.

### III. und IV. Hauptteil.

#### Untersuchungen über die Beeinflussung des Phagocytoseversuches durch

##### A. Aggressine — B. Bakteriolytische Immunsera.

Noch mehr als die Untersuchungen über die „opsonische“ Wirkung des Streptokokkenimmunserums, das für uns Vertreter der hypothetischen Gruppe der „bakteriotropen“ Antisera war, muß mein Beitrag zur Kenntnis des Verhaltens im Phagocytoseversuch der übrigen zwei Substanzgruppen, der Aggressine und der typischen bakteriolytischen Sera, auf ein abschließendes Urteil verzichten.

Die Versuche mit Aggressin führen die Versuche über Diphtheriebacillen in dem Sinne, in welchem sie ursprünglich unternommen waren, fort, indem sie, wie es dort in der Verwendung von Toxin geschah, auf den Einfluß phagocytosehemmender Substanzen gehen; die Beziehung ist eine um so engere, als, wie oben auseinandergesetzt, die Identität von Aggressinen und Toxinen für mich mehr als wahrscheinlich ist.

Die Versuche mit bakteriolytischem Serum sollten die Probe auf das Exempel der Streptokokkenversuche machen, deren Ziel und Ergebnis war, die Wirkung opsonischer bzw. bakteriotroper Sera auf Bakteriolytine zurückzuführen; nachdem auch die Diphtherieversuche in ihrem Verlaufe sich den Streptokokkenversuchen angeschlossen haben, besteht auch zu ihnen dieselbe Beziehung der Nachprüfung.

Nur um zu zeigen, daß auch hier die Ergebnisse die Richtung weisen, mit der unsere Annahmen, wie sie eingangs auseinandergesetzt wurden, sich am ehesten vertragen, teile ich nachstehenden Versuch mit<sup>1)</sup>.

1) Die Ausnutzung einiger großer Versuchsreihen mit den verschiedensten Arten von Aggressin (bedeutend früher als die hier verwendeten Versuchsreihen angestellt) hatte mir Zeitmangel unmöglich gemacht.

Tabelle VI.

## Versuch XII.

Wirkung von Aggressin und bakteriolytischem Immunsrum.  
(Versuche vom 25. IX. und 29. IX. 07.)

Zusatz zum Leukocyten- Bakterien-Gemisch	1. Versuch Staphylo- coccus	2. Versuch Staphylo- coccus	1. Versuch Typhus- bacillus	1. Versuch Milzbrand- bacillus
Inakt. Ser. allein	$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1,73}{1,80} = 0,96 \\ \frac{1,96}{1,80} = 0,54 \end{array} \right\}$	$\frac{1,80}{1,80} = 0,09$	$\frac{1,80}{1,80} = 0,06$	$\frac{1,33}{1,40} = 0,23$
Aktiv. Ser. allein	$\frac{3,92}{1,80} = 3,92$	$\frac{1,61}{1,80} = 1,61$	$\frac{1,24}{1,80} = 1,24$	$\frac{1,47}{1,80} = 1,47$
Aktiv. Ser. + spezifisches Aggressin	$\frac{1,65}{1,80} = 0,65$	$\frac{5,73}{3,60} = 5,73$	$\frac{1,60}{1,80} = 1,60$	$\frac{1,88}{1,80} = 1,88$
Aktiv. Ser. + nichtspezif. Aggressin (Typh.-Aggr.)	$\frac{2,23}{1,20} = 2,23$	$\frac{3,48}{2,60} = 3,48$		
Aktiv. Ser. + nichtspezif. Aggressin (Chol.-Aggr.)	$\frac{4,31}{1,80} = 4,31$	$\frac{7,57}{4,60} = 7,57$		
Aktiv. Ser. + nichtspezif. Aggressin (Milzbr.-Aggr.)	$\frac{5,93}{3,60} = 5,93$			
Aktiv. Ser. + nichtspezif. Toxin (Diphth.-Toxin)		$\frac{2,66}{1,80} = 2,66$		
Aktiv. Ser. + nichtspezif. Antitoxin (Diph.-A.-T.)		$\frac{2,76}{1,80} = 2,76$		
Aktiv. Ser. + spezifisches bakteriolyt. Immunsr.			$\frac{6,57}{3,60} = 6,57$	

Zu diesem Versuch ist folgendes zu bemerken. Die verschiedenen Aggressine sind nicht einander gleichzusetzen.

Das Staphylococcus-Aggressin des ersten Versuches war aus einem Tier gewonnen, das der Infektion schon nach 6 Stunden erlag, also wohl an Intoxikation starb, in dessen Exsudat nach meiner Auffassung (vergl. meine Arbeit über Aggressine, sowie mein Sammelreferat) somit reichlich Toxin vorhanden sein mußte.

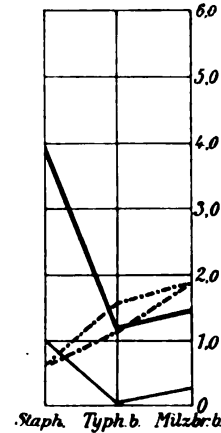
Anders bei den übrigen Aggressinen; das Staphylokokken-aggressin des 2. Versuches entstammt einem Tier, das mit einer erheblich kleineren Dosis Staphylokokken infiziert worden war, damit, wenn Bail recht hätte, die Bakterien Zeit hätten, ihre Aggressivität zu entwickeln. Beim Typhustier war der Verlauf ein mittelschneller (Tod in ca. 24 Stunden), beim Milzbrandtier ein protrahierter (Tod nach ca. 3 Tagen; das „Aggressin“ mußte noch intra vitam entnommen werden).



Nach Bails Voraussetzungen mußte somit das zweite Staphylokokken-, sowie das Typhus- und Milzbrandaggressin eine Hemmung der Phagocytose erzielen, nach meinen Voraussetzungen umgekehrt das erste Staphylokokken-Aggressin. Daß der Versuch gemäß meinen Voraussetzungen verlief, zeigen Tabelle VI und Fig. 9 mit aller wünschbaren Deutlichkeit.

— aktives Serum ohne Zusatz  
 — inaktives Serum „ „  
 - - - - - aktives Serum mit Aggressin

Fig. 9. Versuch mit Staphylokokken-, Typhus- und Milzbrandbacillen: Wirkung von spezifischem Aggressin.



Zweitens zeigt der Versuch, daß auch das bakteriolytische (Typhus-)Immunserum (sehr lange aufbewahrt, so daß an „Opsonin“ nicht wohl gedacht werden kann) sich unserer Voraussicht entsprechend verhält (bei Versuchen mit bakteriolytischem Serum ist eine sehr sorgfältige Dosierung nötig, um Lyse und Agglutination auszuschalten). Bakteriolytisches Typhus-Immunserum ergab eine sehr starke Steigerung der Phagocytose (von 1,24 auf 6,57, also um mehr als das Fünffache). Um die Erklärung dieses Effektes durch „Bakteriotropin“ streng auszuschließen, müßte das Immunserum natürlich noch mit inaktiviertem Normalserum zusammen auf seine Wirkung untersucht werden.

Wenn ich es somit nach allem für angezeigt halte, mich mit Bezug auf die verschiedenen Fragen nur unter Vorbehalt zu äußern, so glaube ich doch sagen zu dürfen, daß die Hoffnung doch an Begründung gewonnen zu haben scheint, es möchte gelingen, die Erscheinungen der Infektion und Immunisierung einfacher zu erklären, als es in der letzten Zeit üblich gewesen ist.

#### Anhang.

Ganz in demselben Sinne einer Anregung zu weiteren Versuchen teile ich **anhangsweise einen sehr merkwürdigen Versuch** mit, der zugleich mit dem zuletzt besprochenen, als

eine Ergänzung zu ihm und auch zu den Diphtherieversuchen, unternommen worden war.

Grundlage der vorige Versuch, soweit er von Stamm 29, 31, 76, RI handelt.

Erweiterung durch Prüfung der Phagocytose eben dieser Streptokokkenstämme, sowie eines Staphylokokkenstammes, unter Zugabe von Diphtherietoxin und -antitoxin.

Diese Erweiterung des Hauptversuches sollte dem Einwurf Rechnung tragen, den man den Diphtherieversuchen machen konnte, daß nämlich für die Phagocytosesteigerung, die das Diphtherieantitoxin gegenüber Diphtheriebacillen bewirkt, nicht spezifische Antikörper, sondern irgendein nicht-spezifischer, physikalischer oder chemischer oder physikalisch-chemischer Faktor verantwortlich sei.

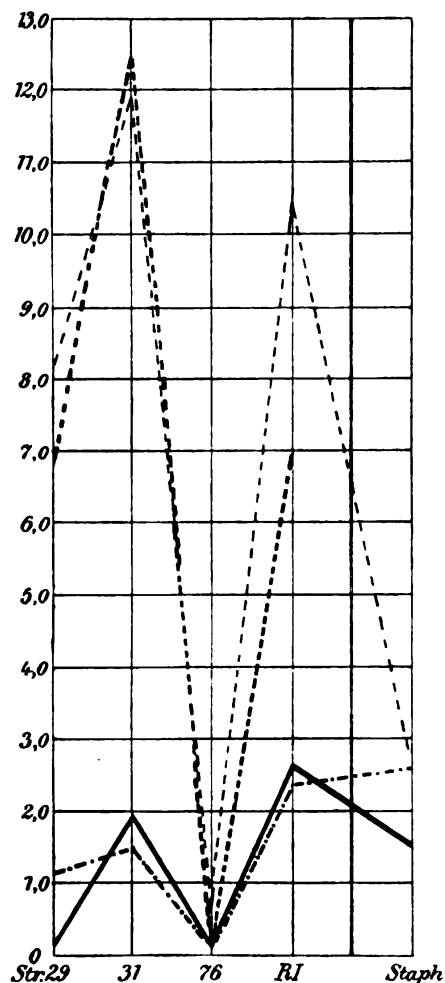
Ich erwartete freilich mit Bestimmtheit ein negatives Resultat und machte den Versuch eigentlich nur pro forma.

Zu meiner größten Ueberraschung war das Ergebnis ein ganz unzweideutig positives, d. h. es zeigte sich, daß diejenigen Streptokokkenstämme, die durch Streptokokkenimmunserum eine Steigerung der Phagocytose erfuhren, auch von Diphtherieantitoxin im selben Sinne beeinflusst wurden, und auch im selben Maße.

Tabelle VII. Versuch XIII.  
Streptokokken-Hauptversuch B.  
2. Kombination.  
(Vom 29. IX. 07.)

	Str. 29	Str. 31	Str. 58	Str. 76	Str. U. e.	Str. R. I	Staphylococcus
Inakt. Ser.	$\frac{1}{20} = 0,04$	$\frac{1}{20} = 0,32$	$\frac{1}{20} = 0,20$	$\frac{1}{20} = 0,00$	$\frac{1}{20} = 0,05$	$\frac{1}{20} = 0,25$	
Aktiv. Ser.	$\frac{1}{8} = 0,33$	$\frac{1}{8} = 1,19$	$\frac{1}{8} = 0,00$	$\frac{1}{8} = 0,08$	$\frac{1}{8} = 0,08$	$\frac{1}{8} = 2,65$	$\frac{1}{8} = 1,75$
„ „ + Antiserum	$\frac{1}{8} = 6,83$	$\frac{1}{8} = 12,47$	$\frac{1}{8} = 9,58$	$\frac{1}{8} = 0,19$	$\frac{1}{8} = 2,01$	$\frac{1}{8} = 6,90$	
„ „ + Diph.-Toxin	$\frac{1}{8} = 1,14$	$\frac{1}{8} = 1,50$		$\frac{1}{8} = 0,22$	u. $\frac{1}{8} = 3,24$	$\frac{1}{8} = 2,40$	$\frac{1}{8} = 1,85$
„ „ + Diph.-Antitox.	$\frac{1}{8} = 8,06$	$\frac{1}{8} = 11,88$		$\frac{1}{8} = 0,60$		$\frac{1}{8} = 10,52$	

Fig. 10 zeigt dies in aller wünschbaren Eindeutigkeit.  
 Die Uebereinstimmung der zwei Serien  
 Streptokokkenimmunserum + aktives Serum  
 Diphtherieantitoxin + „ „  
 geht vollständig durch, ist bei allen vier Stämmen dieselbe (bei sehr verschiedenem Verhalten der Stämme unter sich!).



Dieses wirklich verblüffende Ergebnis hat mich veranlaßt, die Versuche noch einmal aufzunehmen, als meine Verpflichtungen mir vorübergehend die nötige Muße ließen. Drei Anläufe sind mißglückt, wie oben (p. 745) des Näheren dargetan wurde. Bei diesen Versuchen habe ich leider meinen Vorrat an Antitoxin vollständig aufgebraucht. Bei Nachprüfung wird man das Antitoxin natürlich zuerst auf sein Verhalten gegenüber Diphtherie-

Fig. 10. Versuch mit Streptokokken (und Staphylokokken): Wirkung von Antistreptokokken und Diphtherieserum, sowie Diphtherie-Toxin.

bacillen untersuchen müssen, um festzustellen, ob in diesem wichtigen Punkt Uebereinstimmung mit meinem Serum herrscht.

Die verschiedenen Erklärungsmöglichkeiten eingehend zu erörtern, wäre wohl verfrüht, bevor wir mehr Tatsächliches wissen.

Bemerkenswert ist in höchstem Maße, daß gegenüber dem Staphylococcus der Antitoxinzusatz ohne Wirkung blieb.

Wichtig genug — das braucht nicht erst gesagt zu werden — ist der Gegenstand, um zu gründlicher Prüfung aufzufordern.

Er rechtfertigt (solange nicht gezeigt ist, daß es sich hier um ein Phänomen handelte, das irgendeinem — mir allerdings ganz unerfindlichen — Zufall zugeschrieben werden muß), wie alle unseren übrigen Ergebnisse, die Skepsis gegenüber unserem bisherigen, scheinbar so wohlabgeschlossenen Wissen, zu der ich schon vor bald 3 Jahren am Ende meiner großen kritischen Arbeit gekommen war.

### **Zusammenfassung.**

Wir fassen die Ergebnisse zusammen:

#### **A. der Vorversuche:**

1) Für den Phagocytoseversuch ist der Salzgehalt, die osmotische Spannung, die relative Menge der Bakterien, Fehlen narkotischer Substanzen im Serum (keine oder nur leichte Narkose bei der Blutentnahme), Dauer des Versuches von maßgebender Bedeutung.

2) Für die Phagocytose kommen individuelle Unterschiede der Versuchstiere, die Leukocyten und Serum liefern, nicht in erheblichem Maße in Betracht.

3) Es sind, um gröbere Fehler (von mehr als durchschnittlich 5—10 Proz.) zu vermeiden, ungefähr 100 Leukocyten auszuzählen (nicht nur 20), besonders bei ungleichmäßiger Phagocytose, zumal bei Haufenbildung.

4) Um die störende Verklumpung der Phagocyten zu vermeiden, ist physiologische Natriumcitratlösung (1 Proz. Citrat + 0,63 Chlornatrium) zu empfehlen; ob die Lösung ganz different, ist fraglich (Bakteriolyse bei längerem Kontakt!).

#### **B. Hauptversuche:**

1) a) Diphtheriebacillen werden, wie die meisten Bakterien, nur in aktivem Serum phagocytiert, verschiedene Stämme (bei gleicher Dichtigkeit) in verschiedenem Grade, echte, virulente und avirulente, sowie Pseudostämme, ohne deutlichen Unterschied.

b) Zugabe von Diphtherieantitoxin erzielt eine bedeutend stärkere Phagocytose als aktives Serum allein, aber nur unter Mitwirkung von aktivem Serum. Der Einfluß macht sich avirulenten echten, sowie Pseudostämmen gegenüber besonders stark geltend. Bei sehr reichlichem Zusatz von Antitoxin

zeigen letztere Stämme eine Herabsetzung der Phagocytose, die auf einer Verminderung der Bakterienzahl (durch Bakteriolyse?) zu beruhen scheint.

Schluß: Unter Voraussetzung der herrschenden Anschauungen wäre zu schließen, daß das Diphtherieantitoxin (neben Antitoxin) einen bakteriolytischen Ambozeptor enthält, der in Verbindung mit aktivem Serum bei mäßigem Zusatz nur Steigerung der Phagocytose, bei reichlichem Zusatz auch Bakteriolyse (besonders bei nichtvirulenten Stämmen) zur Folge hat.

2) a) Streptokokken werden ebenfalls im allgemeinen nur in aktivem Serum phagocytiert, doch sind Ausnahmen nicht ganz selten (3 von 10 Fällen). Ueber das Verhältnis des Grades der Phagocytose zur Virulenz ist nichts Bestimmtes auszusagen.

b) Streptokokkenimmunserum (nach Menzer, von Merck) kann die Phagocytose (ob nur unter Mitwirkung von aktivem Serum, unentschieden!) beträchtlich steigern, kann sie aber auch, unter vorläufig unbekannten Bedingungen (reichlichem Zusatz?) herabsetzen, letzteres unter Verminderung der Bakterienzahl (Bakteriolyse?, Agglutination?).

Schluß: Den fraglichen Tatsachen zufolge, kann es sich auch im Streptokokkenantiserum um einen bakteriolytischen Ambozeptor handeln, dessen Wirkung, je nachdem die zugeetzte Menge größer oder kleiner ist, sich in Bakteriolyse oder nur in Steigerung der Phagocytose äußert. Doch ist noch festzustellen, ob die Phagocytose nur unter Mitwirkung von aktivem Serum gesteigert wird, ferner, ob nicht noch Agglutinine im Spiele sind.

3) Versuche mit Staphylokokken, Typhusbacillen, Milzbrandbacillen zeigen:

a) daß sogenannte Aggressine nur phagocytosehemmend wirken, wenn in ihnen reichliches Gift vermutet werden kann (ob Wirkung auch nicht spezifisch, nicht bestimmt), daß sie andernfalls, wie normales Serum, der Phagocytose günstig sind,

b) daß typische bakteriolytische Sera (Typhusserum) die Phagocytose sehr befördern.

NB. Der Versuch des Anhangs gibt dem Gedanken einer ganz andersartigen Erklärungsmöglichkeit der festgestellten Tatsachen Raum.















